

Tesis Doctoral

¿La neurotoxicidad del etanol depende del estadio de diferenciación neuronal? Estudio en cultivos primarios de neuronas corticales

Guadagnoli, Tamara

2014-07-18

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Guadagnoli, Tamara. (2014-07-18). ¿La neurotoxicidad del etanol depende del estadio de diferenciación neuronal? Estudio en cultivos primarios de neuronas corticales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Guadagnoli, Tamara. "¿La neurotoxicidad del etanol depende del estadio de diferenciación neuronal? Estudio en cultivos primarios de neuronas corticales". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-07-18.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

“¿La neurotoxicidad del etanol depende del estadio de diferenciación neuronal? Estudio en cultivos primarios de neuronas corticales”.

Resumen

El abuso de alcohol conduce a graves problemas sanitarios y sociales, tanto por la elevada incidencia de su consumo como por las diferentes patologías asociadas a él, entre las que merecen destacarse las producidas a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC).

Las neuronas son particularmente sensibles al efecto neurotóxico del etanol (EtOH). En este trabajo se demostró que las neuronas corticales en cultivo son susceptibles al daño inducido por el EtOH. Es sabido que no todas las neuronas son igualmente susceptibles al daño inducido por el EtOH, y que hay estadios en el desarrollo de las neuronas en que son más vulnerables, por ello se analizaron los efectos del EtOH en dos estadios distintos del desarrollo neuronal. Se trató a las neuronas corticales con EtOH a los 7 y a los 14 días de crecimiento *in vitro* y se observó que cuanto más maduras son las neuronas más sensibles se vuelven al daño, aumentando el número de células que mueren por apoptosis y necrosis. En este trabajo se demostró también, un aumento en la expresión de caspasa-9 activa y de caspasa-3 activa en los cultivos tratados con EtOH. Así mismo, se demostró que la exposición a EtOH afecta la morfología neuronal, ya que se observó una disminución en la longitud del árbol dendrítico, como consecuencia de una reducción en el largo de las dendritas primarias y secundarias, y del número de dendritas secundarias. La exposición a EtOH también produjo cambios en la expresión de las proteínas sinápticas como PSD-95 y sinaptofisina.

Además se observaron cambios ultraestructurales en los cultivos tratados con EtOH, como la presencia de cuerpos en degeneración, núcleos indentados, aumento del lumen del retículo endoplasmático, del número de gotas de lípidos y de lisosomas, así como también, desorganización del aparato de Golgi y de las mitocondrias.

Palabras clave: Etanol, cultivo primario, neuronas corticales, neurotoxicidad, muerte celular.

"Neurotoxicity of ethanol depends on the stage of neuronal differentiation? Study in primary cultures of cortical neurons. "

Abstract

Alcohol abuse leads to serious health and social problems, both for the high incidence of consumption as different associated pathologies, including those produced in the central nervous system (CNS).

Neurons are particularly susceptible to neurotoxic effects of ethanol (EtOH). This work showed that cultured cortical neurons are susceptible to damage induced by EtOH. It is known that not all neurons are equally susceptible to damage induced by EtOH, and there are stages in the development of neurons in which they are most vulnerable, so we analyze the effects of EtOH at two different stages of neuronal development. Cortical neurons were exposed to EtOH at 7 and 14 days of *in vitro* growth and found that mature neurons become more susceptible to damage, increasing the number of apoptotic and necrotic cells. In this work, an increase in the expression of caspase-9 active and caspase-3 active in cultures treated with EtOH was shown. Likewise, it was shown that EtOH exposure affects neuronal morphology, characterized by a decrease in the length of dendrite tree as a result of a reduction in the length of the primary and secondary dendrite, and the number of secondary dendrites. EtOH exposure also produced changes in the expression of synaptic proteins such as PSD- 95 and synaptophysin.

Furthermore ultrastructural changes were observed in cultures treated with EtOH, the presence of degenerating bodies and indented nuclei, dilated lumen of the endoplasmic reticulum, and increased of the number of lipid droplets and lysosomes, and also disruption of the Golgi apparatus and mitochondria.

Keywords: Ethanol, primary culture, cortical neurons, neurotoxicity, cell death.

Agradecimientos

A la Dra. Alicia Brusco por su paciencia, cariño y apoyo; por confiar en mí y darme la oportunidad de hacer este doctorado trabajando libremente.

A la Dra. Mariela Gironacci por enseñarme a trabajar en cultivos primarios y por brindarme sus conocimientos, por sus correcciones siempre bienvenidas.

A las Diosas!!! Pau gracias por derramar alegría y felicidad por donde vas, por tu energía positiva!! A Trini por su incansable ayuda y por todo lo que me has enseñado!! A Lau por poner orden, esmero y dedicación, por contagiar tu vocación a la investigación!! A Euge por salvarme mil veces, por tu ayuda y cariño!! A Mery por su simpatía y amistad, por nuestras largas charlas sobre la vida!! A todas y cada una de ustedes por acompañarme y guiarme en todos estos años en el labo, por hacer que esos años sean inolvidables!!! Las quiero amigas...

A Vito por sus consejos y por su colaboración, por tu amor a la ciencia!! A Sergio por ser un alma libre!! A Lisandro por su paciencia!!

A Marina por su ayuda con los últimos experimentos, cuando parecía imposible poder terminar!!! Muchas muchas por tus enseñanzas. A Marga por su ayuda con la microscopía electrónica. A Silvia por estar siempre lista para resolver problemas!!!

A Andrea Peccile por su amistad y cariño por estar siempre dispuesta a ayudarme, ella sacrificó todos los animales por mí, sin ella no hubiera podido hacer este trabajo. Muchas Gracias Andre!!!

A todos los animales de experimentación que fueron sacrificados en este trabajo les agradezco su invaluable servicio.

A todos las maravillosas personas que conocí y con las que compartí todos estos años...

A mis amigas de la Facu: Gise, Gabi, Vale, Guille, Vicky y Ceci por compartir tantas cosas, por ayudarme a crecer y a transitar los hermosos años de la facultad, una de las etapas más lindas de mi vida!!

A mis amigas de toda la vida, por estar y no estar, por hacer que el tiempo no pase cuando nos vemos.

A mi Papá y a mi Mamá porque gracias a sus esfuerzos pude estudiar Biología gracias por su apoyo y amor incondicional, por estar siempre a mi lado y alentarme!! Los amo profundamente son un ejemplo de trabajo y dedicación. Porque a ustedes les debo la persona que soy, les estoy eternamente agradecida.

A mi hermana, Yani por su espontaneidad, por ser un ejemplo de Madre, porque ella y Javi me demuestran que se puede avanzar incluso frente a las mayores adversidades. Gracias por su lucha y fortaleza!

A Marco, Wensy y Azul mis tres soles, gracias por enseñarme a ser Tía con ustedes aprendí a cambiar pañales, hacer mamaderas y a no dormir de noche, los quiero con toda mi alma. Sigo aprendiendo de ustedes!!

A Sil, y Osky por ser mis segundos padres, siempre me han tratado como a una hija, gracias por enseñarme tantas cosas especialmente a ser mejores personas.

A Patri por ser como una hermana para mí, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por tus enseñanzas y consejos. Por estar lejos y siempre sentirte cerca. A Gerar por ser su gran compañero.

A Juanito y Catita, que ganas de tenerlos más cerca y poder compartir más momentos, los extraño mucho! Los adoro!

A Sandrita por ser una integrante más de la familia, siempre a mi lado, con una sonrisa y palabras de aliento por cuidarme y mimarme desde muy chica, por ser la “culpable” de muchos de mis caprichos!!! Como te quiero!!

A mis tíos y primos que son muchos pero que cada uno ocupa un lugar muy importante en mi vida, los quiero con toda mi alma, son una red de amor y contención!!! GRACIAS!!!

A la familia de LUZ que todos formamos, por el despertar de la conciencia de la humanidad y por la ascensión del planeta.

A mi alma gemela, el gran amor de mi vida, Gus, muchas gracias por estar a mi lado, por haberme elegido y por seguir haciéndolo... por hacerme inmensamente FELIZ, por confiar en mí siempre y darme las fuerzas para poder terminar esta etapa. Por enseñarme a disfrutar de las pequeñas cosas de la vida, por enseñarme a soñar y demostrarme que los sueños pueden hacerse realidad. Le doy gracias a Dios por ponerte en mi camino y por la hermosa familia que juntos construimos.

Al bebé que estoy esperando, gracias por elegirnos, estamos muy felices con tu llegada, gracias Dios por este nuevo gran regalo!!!!

Al mayor regalo que la vida nos pudo haber ya dado, nuestro primer hijo, Ciro. Por ser un ser de LUZ que ilumina nuestras vidas. Gracias por ser mi Gran Maestro!!

Abreviaturas	10
1. INTRODUCCION	13
1.1. EL ETANOL (EtOH)	14
1.1.1. Farmacocinética	15
1.1.2. Farmacodinamia	18
1.1.3. Efectos del alcohol en la fisiología humana	18
1.1.3.1. Efectos del alcohol sobre el SNC	19
1.1.3.2. Alcoholismo Materno Fetal (AMF)	22
1.2. ASPECTOS GENERALES DE LA CORTEZA CEREBRAL	23
1.2.1. Neuroanatomía de la corteza cerebral	23
1.2.2. NEURONA	24
1.2.2.1. Soma	25
1.2.2.2. Dendritas	25
1.2.2.3. Axón	26
1.2.3. SINAPSIS	26
1.2.3.1. Sinaptofisina	28
1.2.3.2. PSD-95	28
1.2.4. EL CITOESQUELETO NEURONAL	29
1.2.4.1. La proteína asociada a microtúbulos de tipo 2 (MAP-2)	29
1.2.5. Tipos de neuronas corticales	30
1.3. MUERTE CELULAR	31
1.3.1. Tipos y clasificación	31
1.3.1.1. Según la morfología	31
1.3.1.2. Muerte regulada o accidental	33
1.3.1.3. Muerte Celular Programada	33
1.3.1.4. Muerte Fisiológica o Patológica	33
1.3.2. La muerte necrótica	33
1.3.3. La apoptosis	35
1.3.3.1. Las caspasas: el principio del fin	35
1.3.3.2. Dos caminos, un destino: las dos principales vías apoptóticas en células de mamífero	38
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIALES Y METODOS	45
3.1. Animales	45
3.1.1. Cuidado de los animales	45
3.2. CULTIVOS CELULARES	45
3.2.1. Obtención de cultivos primarios de neuronas corticales	45
3.2.2. Caracterización de los cultivos primarios neuronales	46
3.2.3. Tratamiento de los cultivos neuronales	46
3.3. ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR	47
3.3.1. Ensayo de MTT	47
3.4. ESTUDIOS DEL TIPO DE MUERTE CELULAR	48
3.4.1. Determinación del tipo de muerte celular por tinción con Bromuro de Etidio y Naranja de Acridina	48
3.4.2. Estudio de apoptosis celular por la técnica de TUNEL y coloración con Hoechst 3342	49
3.4.3. Análisis del efecto del EtOH sobre el contenido proteico de proteínas apoptóticas por ensayo de western blot	51
3.4.3.1. Obtención de fracción proteica total	51
3.4.3.2. Electroforesis y electrotransferencia	51
3.5. ESTUDIOS MORFOLOGICOS	53
3.5.1. Inmunofluorescencia	53

3.6. ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES _____	54
3.7. ANALISIS ESTADISTICO _____	55
4. RESULTADOS _____	57
4.1. Caracterización de los cultivos primarios neuronales _____	57
4.2. Efecto del EtOH sobre la viabilidad celular en cultivos primarios de neuronas corticales _____	60
4.3. Estudio del tipo de muerte celular inducida por EtOH mediante la utilización de naranja de acridina/ bromuro de etidio _____	64
4.4. Medida del efecto de la exposición a etanol sobre la apoptosis celular mediante la técnica de TUNEL _____	67
4.5. Efecto del EtOH sobre el contenido proteico de proteínas apoptóticas _____	70
4.5.1. Efecto del EtOH sobre el contenido proteico de Caspasa 9 activa _____	70
4.5.2. Efecto del EtOH sobre el contenido proteico de Caspasa 3 activa _____	73
4.6. Efecto de la exposición a EtOH sobre la morfología neuronal _____	75
4.6.1. Análisis morfométricos en cultivos de 7 días de crecimiento <i>in vitro</i> expuestos a EtOH _____	75
4.6.2. Análisis Morfométricos en cultivos neuronales corticales de 14 días de crecimiento <i>in vitro</i> _____	79
4.7. Patrón de expresión proteica de proteínas sinápticas luego de la exposición a EtOH _____	83
4.7.1. Efecto del EtOH sobre el contenido proteico de Sinaptofisina _____	83
4.7.2. Efecto del EtOH sobre el contenido proteico de PSD-95 _____	86
4.8. Efecto del EtOH sobre la ultraestructura neuronal _____	88
4.8.1. Ultraestructura de las neuronas corticales _____	88
4.8.2. Ultraestructura de la sinapsis en cultivos primarios neuronales _____	92
4.8.3. Número de microtúbulos (MT) _____	94
5. DISCUSION _____	96
5.1. La exposición a EtOH afecta la viabilidad neuronal _____	96
5.2. Concentración de EtOH en sangre vs. concentración de EtOH en el medio de cultivo _____	97
5.3. La exposición a EtOH induce muerte celular: apoptosis o necrosis _____	99
5.4. ¿El momento de la exposición a EtOH afecta la sensibilidad? _____	100
5.5. Estudio de la cascada de señalización involucrada en el efecto neurotóxico del EtOH _____	102
5.6. Efecto de la exposición a EtOH sobre la morfología neuronal _____	103
5.7. Efecto de la exposición a EtOH sobre proteínas sinápticas _____	105
5.8. Efecto del EtOH sobre la ultraestructura neuronal _____	106
6. CONCLUSIONES _____	112
7. BIBLIOGRAFIA _____	115

*No crean en algo porque lo diga la tradición.
Ni siquiera porque generaciones hayan creído en ello por siglos.
No crean en algo porque muchos lo crean, o finjan que lo crean.
No crean algo porque así lo hayan creído sabios de otras épocas.
No crean a ningún otro ser humano.
Crean únicamente en lo que ustedes mismos hayan experimentado,
Verificado y aceptado, después de someterlo
al dictamen del discernimiento y a la voz de la conciencia.
Gautama Buda*

Abreviaturas

ADN: Acido desoxirribonucleico
ADH: Alcohol deshidrogenasa
AMF: Alcoholismo Materno Fetal
ANOVA: Análisis de la varianza
ALDH: Aldehído deshidrogenasa
ARN: Acido Ribonucleico
BEC: Concentración de etanol en sangre
BrEt: Bromuro de Etidio
CYP2E1: citocromo P450-2E1
DIV: Día *in vitro*
D-MEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco
DPN: Día postnatal
dUTP: Desoxiuridina trifosfato
EMCE: Exposición materna crónica al Etanol
ESM: Error estándar de la media
EtOH: Etanol
FADD: Proteína con dominio de muerte asociado a Fas
FI: Filamentos intermedios
GFAP: Proteína fibrilar acida de la glía
HMWMAP-2: MAP-2 de alto peso molecular
Hs: Horas
IAPs: Proteínas inhibidoras de la apoptosis
IF: Inmunofluorescencia
KDa: Kilodaltons
LMWMAP-2: MAP-2 de bajo peso molecular
MAGUK: miembro de la familia guanilato quinasa asociada a membrana
MAP: Proteína asociada a microtúbulos
MCPD: Muerte celular propia del desarrollo
MET: Microscopía electrónica de transmisión
MF: Microfilamentos
MTs: Microtúbulos
MTT: Bromuro de 3,4-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NA: Naranja de Acridina

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido
 NMDA: N-metil d-aspartato
 NOCD: Muerte celular que ocurre naturalmente
 NO: óxido nítrico
 NF: Neurofilamentos
 NFs: Neurofilamentos
 NO: Óxido nítrico
 NTs: Neurotúbulos
 ONOO⁻: Peroxinitritos
 PAF: Paraformaldheido
 PARP: Polimerasa poli ADP-ribosa
 PBS: Buffer fosfato salino
 PKA: Proteína quinasa A
 PKC: Proteína quinasa C
 PM: Peso molecular
 PS: Fosfatidilserina.
 PSD-95: Proteína de densidad postsináptica 95
 RE: Retículo endoplasmático
 REL: Retículo endoplasmático liso
 RER: Retículo endoplasmático rugoso
 ROS: Especies reactivas de oxígeno
 SAP-90: Proteína asociada a la sinapsis 90
 SAF: Síndrome alcohólico fetal
 SNC: Sistema nervioso central
 SNO: Suero normal de oveja
 SOD: Superóxido dismutasa
 TdT: Enzima deoxinucleotidil transferasa terminal
 TNFR: Factor de necrosis tumoral

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

Un poco de historia...

La historia de las bebidas alcohólicas va ligada a la propia historia del ser humano. El consumo de alcohol ha formado parte de nuestra cultura y sociedad durante siglos. Probablemente ningún comportamiento humano ha ocasionado tantas controversias, mitos, prejuicios, malentendidos e incomprensiones como el consumo de alcohol.

Desde tiempos muy remotos el hombre aprendió a fermentar granos y jugos para obtener una sustancia que le provocaba un estado especial. Este estado varía en las diferentes personas de acuerdo a la cantidad ingerida y de acuerdo a las motivaciones de su injerencia. Nos referimos al estado de intoxicación alcohólica.

Las bebidas fermentadas existen desde los albores de la civilización egipcia, y existe evidencia de una bebida alcohólica primitiva en China alrededor del año 7000 a.C. En la India, una bebida alcohólica llamada sura, destilada del arroz, fue utilizada entre los años 3000 y 2000 a.C. Los babilónicos adoraban a una diosa del vino tan antigua que data aproximadamente del año 2700 a.C. En Grecia, una de las primeras bebidas alcohólicas que ganó popularidad fue el aguamiel, una bebida fermentada hecha de miel y agua. La literatura griega está llena de advertencias contra los excesos de la bebida.



Diferentes civilizaciones nativas americanas desarrollaron bebidas alcohólicas durante la época precolombina. Una variedad de bebidas fermentadas de la región de los Andes, en Sudamérica, se hacían a base de maíz, uvas o manzanas y se le dio el nombre de "chicha".

En el siglo XVI, las bebidas alcohólicas (conocidas como "espíritus") se utilizaban ampliamente con propósitos curativos. A principios del siglo XVIII, el parlamento inglés aprobó una ley que fomentaba el uso de cereales para la destilación de "espíritus". Estas bebidas alcohólicas, sumamente baratas, inundaron el mercado y llegaron a su punto más alto a mediados del siglo

XVIII. En el Reino Unido, el consumo de ginebra alcanzó los 68 millones de litros y el alcoholismo se generalizó.

El siglo XIX trajo un cambio de actitud y una campaña antialcohólica empezó a promover el uso moderado del alcohol, algo que a la larga se convirtió en una prohibición total. En 1920, en Estados Unidos se aprobó una ley que prohibía la fabricación, venta, importación y exportación de bebidas embriagantes. El comercio ilegal de alcohol se disparó y en 1933, la prohibición del alcohol se canceló.

La influencia del alcohol en la sociedad ha tenido gran peso como factor problemático en la conformación y funcionamiento de la familia, el comportamiento del individuo y por ende de la sociedad. La influencia del alcohol se ha visto reflejada en las diferentes esferas de la historia de la sociedad desde tiempos muy remotos.

1.1. EL ETANOL (EtOH)

El alcohol etílico o etanol (EtOH; C_2H_6O) es un líquido incoloro, translucido, de olor característico, excelente solvente, menos denso que el agua ($\delta=0,789$ g/ml), con un peso molecular (PM) de 46,0634 daltons (**Fig. 1**).

El EtOH se forma por la fermentación anaerobia de algunos glúcidos (como la glucosa, fructosa y manosa) que llevan a cabo ciertas bacterias y hongos espontáneamente (De Rasor y Youra, 1980). Por tal motivo, el EtOH se produce en forma relativamente simple y a bajo costo (Heath, 1974). Se lo encuentra en gran cantidad de productos formando parte de bebidas, perfumes, solventes, productos medicinales y cosméticos.

Las bebidas que lo contienen, según su forma de obtención, se clasifican en fermentadas, destiladas y artificiales. Son las bebidas destiladas las que generalmente contienen la mayor concentración de EtOH (Heath, 1974).

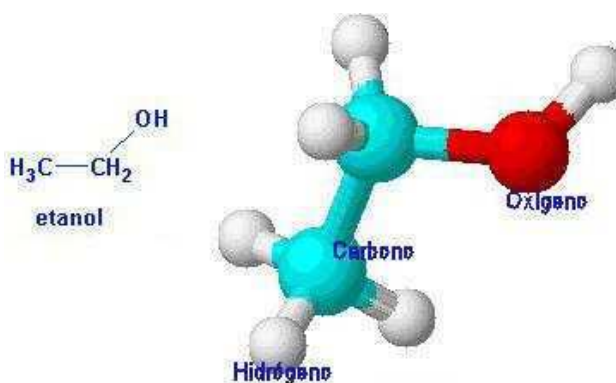


Figura 1. Estructura molecular del EtOH.

1.1.1. Farmacocinética

El EtOH se puede absorber por varias vías. La vía enteral es, por lejos, la de más frecuente uso. Una vez ingerido, la absorción del EtOH se lleva a cabo en un 20% en el estómago y el 80% restante en el duodeno y el yeyuno-íleon. Sin embargo, la absorción varía ampliamente en función de la cantidad y calidad del contenido gástrico y la concentración alcohólica de la bebida ingerida. Así, por ejemplo, en promedio, la ingestión de 44 g de EtOH en forma de whisky (esto es, aproximadamente, unos 77 ml de un whisky de 45°) produce una alcoholemia máxima de alrededor de 67-92 mg/dl si se lo ingiere con el estómago vacío; en cambio, tras la ingestión de una comida mixta la alcoholemia correspondiente será de unos 30-53 mg/dl. Igual cantidad de EtOH consumida en forma de cerveza (esto es, unos 694 ml de una cerveza de 5°, dos latas comunes) produce alcoholemias de 41-49 y 23-29 mg/dl, con el estómago vacío y tras una comida mixta, respectivamente. La distribución es rápida y amplia por tratarse de una molécula de bajo PM y muy hidrosoluble y liposoluble. En virtud de su liposolubilidad atraviesa fácilmente todas las barreras (entre ellas la hematoencefálica y la placentaria, la hematotesticular y la hematoalveolar). Tras la ingestión, en 5 a 10 minutos se lo puede detectar en la sangre y el tiempo hasta la concentración plasmática pico es de 30 a 90 minutos. Para el ser humano, el volumen de distribución del EtOH es, aproximadamente, de 0,7 l/kg para los hombres y de 0,6 l/kg para las mujeres (la diferencia se debe a los distintos porcentajes de grasa corporal total) (Frezza y col., 1990; Baraona y col., 2001).

El EtOH desaparece del plasma, con una cinética de orden cero, entre las 8 a 10 horas posteriores a la finalización de la ingesta. El 90-98% del EtOH ingerido se oxida completamente a una velocidad de 100-150 mg/kg/h. Los alcohólicos crónicos, en tanto tengan una función hepática conservada, pueden presentar un aumento de la velocidad de oxidación; por otro lado, la alcoholemia de una persona que tiene daño hepático puede permanecer elevada más allá de las 24 horas de finalizada la última ingestión.

En el hígado se produce la metabolización del 85-90% del EtOH ingerido. Un 70% se metaboliza por medio de la acción secuencial de las enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldehído deshidrogenasa (ALDH). La ADH oxida el EtOH a acetaldehído y la ALDH lo convierte en acetato. En ambos pasos se generan equivalentes reductores al reducirse nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) a nicotinamida adenina dinucleótico reducida (NADH) (Riveros-Rosas y col., 1997; Nagy, 2004) (**Fig. 2**).

El acetato, posteriormente, y por acción de la acetil-CoA sintetasa, es activado por su unión a la coenzima A para formar acetil-CoA. La acetil-CoA puede ser luego utilizada en varias reacciones anabólicas implicadas, entre otras, en la síntesis de colesterol y ácidos grasos (contribuyendo así con la aparición de la esteatosis hepática – hígado graso – en los alcohólicos crónicos) y de otros constituyentes tisulares (Fig.

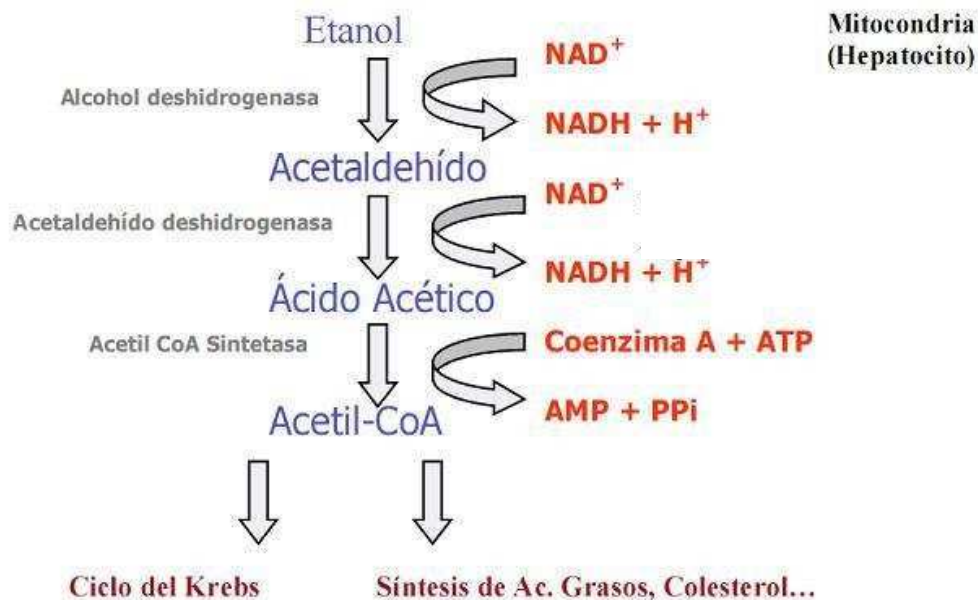


Figura 2. Esquema de la ruta catabólica del alcohol en el hígado. Las consecuencias de la oxidación del alcohol son un incremento en la producción de acetaldehído y un desequilibrio redox, ya que se produce NADH a partir de la NAD^+ . El segundo paso oxidativo consiste en la formación de acetato a partir del acetaldehído, acción catalizada por la ALDH con el concurso también de NAD^+ que se reduce a NADH. Por su parte, el acetato obtenido en el citoplasma del hepatocito es biotransformado en acetil-CoA mediante la acción de la enzima acetilCoA-sintetasa, localizada a nivel mitocondrial (Parés y Caballería, 2000).

Aproximadamente el 10 al 30% del EtOH se oxida por medio del denominado sistema de oxidación del EtOH u oxidasas microsomaes CYP2E1, asociado al retículo endoplasmático liso (REL) de los hepatocitos. Este sistema enzimático es inducible por la acción crónica del mismo EtOH y responsable del leve aumento en la velocidad de oxidación que se observa en los bebedores crónicos (Lieber, 1997). Esta inducción enzimática es también importante desde el punto de vista médico-toxicológico en cuanto a las potenciales interacciones farmacocinéticas con otras drogas y tóxicos.

Existe un gran polimorfismo en los genes que codifican a las enzimas ADH, ALDH y CYP2E1. Se postula que este polimorfismo podría ser responsable de las diferencias de capacidad metabolizadora que se observan entre los sexos, diferentes individuos y grupos étnicos. También serían responsables de las diferentes susceptibilidades o

resistencias a desarrollar dependencia y/o tolerancia al consumo de EtOH. Una consecuencia importante del polimorfismo genético con respecto a las enzimas metabolizadoras es la que se relaciona con la ADH gástrica, responsable de un efecto metabolizador de primer paso, más o menos importante, llevado a cabo en el estómago, antes de que el EtOH se absorba y pueda ejercer sus efectos sobre los órganos blanco. Las enzimas ADH y ALDH presentan variantes genéticas, es decir, se han encontrado varios polimorfismos genéticos que son expresados de manera diferente en los distintos grupos raciales. Así, en algunos estudios étnicos se ha observado que un 40% de los orientales poseen formas (isoenzimas) de ADH más funcionales, es decir, capaces de catabolizar el EtOH de forma más rápida, lo que lleva consigo mayores y más rápidas acumulaciones de acetaldehído. El acetaldehído es tóxico, por lo que en estas personas produce un efecto aversivo, evitando que el sujeto beba en exceso. De este hecho se podría desprender que la forma inactiva de la ADH tendría un efecto disuasorio del consumo de alcohol (Thomasson y col., 1994; Chen et al. 1996; Tanaka et al. 1997; Álvarez-González y Del Río Gracia, 2003).

Un tercer sistema de metabolización es el de la catalasa, enzima presente en los peroxisomas, que oxida al EtOH utilizando peróxido de hidrógeno. Este sistema parecería ejercer su acción sólo ante concentraciones elevadas de la droga y ser de escasa importancia en el metabolismo hepático, no así en el cerebro.

El acetaldehído formado como metabolito intermedio en todos los sistemas metabolizadores del EtOH, es una molécula muy reactiva, responsable de gran parte de los efectos tóxicos atribuidos al propio EtOH. El 2-10% del EtOH que escapa a la oxidación se elimina, sin modificar, por vía renal y pulmonar (principalmente); y en virtud de su capacidad para atravesar membranas, se lo puede encontrar en todas las secreciones corporales.

Desde el punto de vista energético, el EtOH es una molécula con capacidad de liberación de energía de 7,07 kCal/g (es decir, 29,58 kJ). También se almacena energía del EtOH a partir de las moléculas de acetil-CoA que ingresan al ciclo de los ácidos tricarboxílicos en el que se generan más equivalentes reductores que siguen la misma vía. De todas maneras, suele decirse que las calorías aportadas por el EtOH son "calorías vacías" en el sentido de que las bebidas que lo contienen no aportan cantidades significativas de vitaminas, minerales, oligoelementos, proteínas, glúcidos o lípidos. Las calorías generadas por la oxidación del EtOH carecen de acción termogénica. Más importante aún, el EtOH carece de capacidades "bioplásticas", en el sentido de que no pasa a formar parte de moléculas estructurales de las células o los tejidos.

1.1.2. Farmacodinamia

El EtOH tiene varios mecanismos de acción farmacológica. Uno inespecífico en cuanto que, por sus propiedades fisicoquímicas, es capaz de atravesar membranas biológicas y de insertarse e intercalarse entre sus lípidos. De esta manera altera las propiedades de las membranas con las que entra en contacto (altera su grado de fluidez) y, en virtud de las alteraciones metabólicas que induce, altera la composición fosfolipídica de las membranas.

Por otro lado, se postula que el EtOH tiene también un mecanismo de acción específico uniéndose a receptores de neurotransmisores.

En el cerebro, por un lado, el EtOH actúa como un agonista de los receptores GABA_A incrementando su conductancia al Cl⁻ y aumentando así la inhibición sináptica; de este modo, actúa de manera similar a los barbitúricos y las benzodiazepinas, drogas que comparten con el EtOH su capacidad sedativa y depresora del SNC y con las que presenta tolerancia cruzada ante el consumo crónico. Por otro lado, el EtOH actúa como un antagonista de los receptores glutamatérgicos (NMDA) y, de este modo, disminuye la conductancia para los iones divalentes (el Ca²⁺ y el Mg²⁺) a través de este canal iónico. Disminuye así la excitabilidad neuronal, pero induce, a largo plazo, una regulación hacia arriba (o up-regulation) de los receptores NMDA por aumento compensatorio de su expresión en la membrana neuronal. Este fenómeno puede ser el origen de la hiperexcitabilidad observable ante las supresiones o abstinencias agudas tras un consumo crónico. Se sospecha que, en los alcohólicos crónicos, muchas de las manifestaciones de neurotoxicidad provocadas por el EtOH podrían deberse a la excitotoxicidad NMDA-dependiente provocada por las sucesivas abstinencias agudas en aquellos que intentan abandonar su adicción, sin lograrlo finalmente. Esta misma excitotoxicidad por abstinencia aguda es la que se supone que aumenta el daño en el cerebro de los fetos de madres alcohólicas crónicas y fuertemente alcohólicas que, a lo largo del embarazo, presentan sucesivas y frecuentes abstinencias.

1.1.3. Efectos del alcohol en la fisiología humana

El EtOH es tóxico para la mayoría de los tejidos del organismo. Su consumo crónico y excesivo se ha asociado no solo al desarrollo del síndrome de dependencia al alcohol, sino también a numerosas enfermedades inflamatorias y degenerativas que pueden acabar con la vida de los sujetos que las sufren. El paradigma de las lesiones

orgánicas producidas por el consumo crónico de EtOH es la cirrosis hepática. La mayoría de las lesiones hepáticas por alcohol suelen iniciarse en forma de esteatosis hepática, para progresar posteriormente a una hepatitis alcohólica, una cirrosis hepática e incluso un carcinoma primitivo de hígado. De todos modos, las enfermedades producidas por el consumo crónico de alcohol afectan a casi todos los tejidos y sistemas del organismo. Así, tiene efectos graves sobre el sistema cardiovascular (miocardiopatía alcohólica), páncreas (pancreatitis aguda y crónica), SNC (atrofia cerebral y cerebelosa, encefalopatías), nervios periféricos (polineuropatía alcohólica), sistema músculo-esquelético (osteoporosis, miopatía alcohólica) y sobre el feto (síndrome alcohólico fetal). También pueden aparecer, como consecuencia del consumo excesivo crónico de alcohol, enfermedades psicoorgánicas (amnesia lacunar, demencia alcohólica), trastornos psicóticos u otras enfermedades psiquiátricas como ansiedad y depresión. El desarrollo de estas lesiones depende en gran medida de la cantidad de alcohol consumido por los pacientes (dosis total acumulada de alcohol durante toda la vida del sujeto), aunque también influye una cierta predisposición personal (vulnerabilidad genética) y/o el concurso de determinadas circunstancias ambientales como malnutrición o infecciones concomitantes, como, por ejemplo, las producidas por los virus de la hepatitis B y C (Estruch, 2002).

1.1.3.1. Efectos del alcohol sobre el SNC

Mecanismos de acción a nivel molecular del alcohol

El EtOH es la droga legal más comúnmente utilizada luego de la cafeína y la nicotina. Sus acciones afectan virtualmente a todos los órganos del cuerpo, pero su principal efecto lo ejerce sobre el SNC (Tsai y col., 1995; Tabakoff y col., 1996; Diamond y Gordon, 1997; Lovinger, 1997). El EtOH es un neurotóxico que ejerce un efecto complejo sobre las células del SNC y estos efectos son críticos sobre el desarrollo de las mismas.

A diferencia de las demás sustancias de abuso, el alcohol no ejerce sus efectos psicotrópicos a través de su unión a un receptor específico, sino que es capaz de modificar, a nivel de la membrana neuronal, la permeabilidad de algunos canales iónicos y la funcionalidad de determinados receptores particularmente sensibles a la acción del alcohol. Los efectos psicotrópicos percibidos tras el consumo de alcohol resultan por tanto de la suma de estas acciones (Colombo, 1997).

El EtOH es una droga débil; se necesitan decenas de gramos para producir un efecto farmacológico (en contra de lo que ocurre con la mayoría de las drogas de abuso, que actúan en el cuerpo a dosis de miligramos o microgramos por kilogramo). Su molécula no posee un carbono asimétrico, por lo que, su interacción con los sustratos biológicos no es estereoselectiva. La complejidad y multitud de efectos que produce el EtOH contrasta paradójicamente con la simplicidad de su estructura química. El grupo hidroxilo forma un dipolo en la molécula que favorece la formación de puentes de hidrógeno (o la ruptura de otros ya existentes) con proteínas o con las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana. Es la formación de puentes de hidrógeno lo que hace a la molécula soluble en agua en todas las proporciones, y lo que la hace capaz de modificar la organización de moléculas acuosas en la matriz extracelular, pudiendo alterar de este modo la solubilidad de ligandos o iones que interaccionan con receptores de membrana. El EtOH, además, es capaz de producir una perturbación de la arquitectura de la membrana por la alteración del orden o la composición de los lípidos situados dentro de la bicapa lipídica, o por la modificación de la estructura de los fosfolípidos dentro del microdominio proteína-lípido que mantiene la arquitectura de la proteína. Por el contrario, aunque el EtOH puede localizarse también sobre la superficie externa de la membrana e interaccionar con las cabezas polares de los fosfolípidos, este tipo de interacciones producen pequeños efectos y solamente ocurren a altas concentraciones de alcohol (>100 mM). En cualquier caso, la alteración de la fluidez de la membrana neuronal que produce el EtOH no parece ser responsable de los efectos más significativos de esta droga, ya que no sirve para explicar las acciones etílicas más características, como la intoxicación etílica, los *blackouts* (pérdidas de memoria prolongadas durante las borracheras), gran parte de la tolerancia y la hiperexcitabilidad característica del síndrome de abstinencia (Ayesta, 2002). Sin embargo, sí que parecen ser mucho más importantes las interacciones con la estructura aminoacídica de las proteínas, que ocurren a concentraciones más bajas de alcohol (10-50 mM), y que se producen dentro de los "bolsillos hidrofóbicos" situados en los dominios agua-proteína. Estos sitios pueden encontrarse cerca de la interfase agua-lípido, como ocurre con los receptores para GABA de tipo A (GABAA), pueden también situarse en alguna zona del poro del receptor por donde pasan los iones, como ocurre en el caso del receptor NMDA, o por último, pueden localizarse en sitios de modulación alostérica del receptor, en el dominio extracelular amino terminal, donde se encuentre el sitio de reconocimiento del ligando endógeno, como ocurre en el caso del receptor para acetilcolina (Fadda y Rossetti, 1998) (**Fig. 3**).

Como se ve, los efectos farmacológicos del EtOH son, por una parte, no selectivos, puesto que se pueden ver afectadas no solo la organización de la membrana y la función de las enzimas ligadas a ella, sino también la de las enzimas y proteínas implicadas en la transducción de señales, de canales iónicos, ionóforos acoplados a receptores y proteínas transportadoras, al igual que también se puede ver afectada la expresión génica. Sin embargo, por otra parte los efectos del EtOH se pueden también considerar como específicos, puesto que la molécula interacciona con sitios discretos de cada proteína en particular, que son críticos para la función de la proteína y el funcionamiento celular (Fadda y Rossetti, 1998).

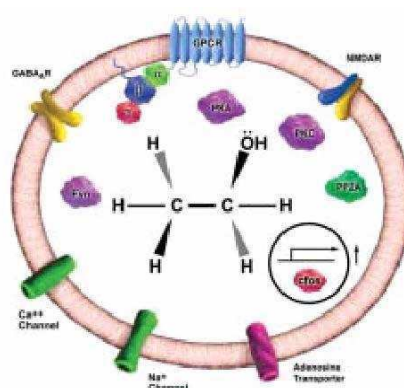


Figura 3. El EtOH es capaz de alterar la función de múltiples componentes celulares. En la figura se representan la fórmula estructural de la molécula de EtOH (centro) y ejemplos de algunas de sus dianas proteicas directas e indirectas. Entre éstas se incluyen canales iónicos abiertos por ligando (receptores NMDA y GABAA); canales iónicos dependientes de voltaje (como los de calcio y potasio); el transportador de adenosina; kinasas como la proteína-quinasa A (PKA), la proteína-quinasa C (PKC) y Fyn, y factores de transcripción como c-fos (Tomado de Ron, 2004).

Por tanto, el EtOH es capaz de influenciar la función de la mayoría, si no todos, los sistemas neuronales, a nivel molecular, celular, y sistémico. Debido a la reversibilidad de la interacción entre el EtOH y las moléculas biológicas, las alteraciones en la función cerebral asociadas con el consumo crónico de alcohol son el resultado de las modificaciones plásticas (adaptativas) que tienen lugar en el cerebro en respuesta a los efectos del EtOH, más que del efecto directo de la droga sobre un sustrato particular. Estos cambios pueden ser de corta o larga duración, pero reversibles, o bien ser permanentes y asociados a procesos degenerativos en determinadas áreas cerebrales (Fadda y Rossetti, 1998).

Una de las cuestiones más relevantes que se plantea al estudiar las modificaciones provocadas por el alcohol a tan distintos niveles es si el EtOH actúa

directamente sobre los neurotransmisores y sus receptores, o si ejerce sus acciones indirectamente, alterando el fino equilibrio de neurotransmisión en el cerebro. El cerebro es una red de sistemas de neurotransmisión, y la mayoría de los neurotransmisores están ligados a los demás ya sea porque comparten una misma ruta metabólica (como es el caso del GABA y el glutamato) o bien por sus conexiones neuronales (por ejemplo, GABA-glutamato-dopamina); también porque comparten, en muchos casos, proteínas G y otras rutas de señalización a nivel de los mecanismos moleculares a los que están acoplados sus receptores. Todos estos sistemas actúan siempre en equilibrio, de modo que si un sistema se altera, el desequilibrio aparecerá en todos los demás.

1.1.3.2. Alcoholismo Materno Fetal (AMF)

La exposición materna crónica al EtOH (EMCE) durante el embarazo causa el Síndrome Alcohólico Fetal (SAF). Este se caracteriza por anomalías en el SNC, retardo en el crecimiento general y dismorfología facial. El AMF puede expresarse como una serie de alteraciones que comprenden desde la normalidad fenotípica aparente hasta el desarrollo completo del SAF pasando por los grados intermedios de los llamados efectos del alcoholismo fetal (Kinsella y Riley, 1999; Riley y col., 2005; Guerri y col., 2009). Desde 1957, el SAF ha sido reconocido como la mayor causa teratogénica de retardo mental (Rouquette, 1957) y la principal causa de muchos trastornos psiquiátricos tanto en niños como en adultos. Los niños afectados por trastornos derivados del SAF exhiben un fenotipo físico típico y varios grados de disfunción del SNC, desde leves trastornos cognitivos y conductuales hasta un retardo mental profundo, incluyendo inteligencia reducida, trastornos lingüísticos, dificultados en el aprendizaje, disfunciones psicomotoras y mentales y epilepsia (Famy y col., 1998). De las mujeres abusadoras crónicas de alcohol, entre el 10-15% de las que se embaracen, parirán niños que presentarán el SAF (Mattson y col., 1997). Estos datos dan una idea de la importancia que tiene para la salud pública el estudio de los problemas relacionados con el AMF, máxime teniendo en cuenta que en nuestro país el consumo de alcohol está en aumento entre adolescentes y mujeres jóvenes (en edad fértil) y con escasos conocimientos y educación preventiva acerca de los daños que provoca el EtOH en el feto.

1.2. ASPECTOS GENERALES DE LA CORTEZA CEREBRAL

Uno de los logros evolutivos más destacables del SNC es la presencia en diferentes grupos de vertebrados de una lámina superficial de células nerviosas conocida como corteza cerebral. A lo largo de la evolución, la corteza cerebral ha aumentado en complejidad y tamaño relativo. En los anfibios, la región paleal telencefálica está formada por una única lámina celular situada en la región periventricular. Sin embargo, en los reptiles aparece ya una estructura de tres capas comparable a las estructuras allocorticales (paleocorteza y archicorteza) del cerebro de los mamíferos, en los cuales además surge una estructura de seis capas denominada neocorteza (Brodmann, 1909; Vogt y Vogt, 1919; revisado en Valverde, 2002). El desarrollo relativo de la neocorteza con respecto al volumen total del cerebro aumenta en los mamíferos a medida que se incrementa el cociente de encefalización. Es decir, gran parte del aumento del cerebro se debe al incremento de la neocorteza, que ha alcanzado su máxima expansión y diferenciación en los primates. Sin embargo, las capacidades cognitivas del hombre no parecen estar simplemente relacionadas con un aumento del tamaño del cerebro. Se considera, que el desarrollo de la neocorteza conlleva la aparición de nuevas áreas corticales y cambios en la organización que darían lugar a una arquitectura diferente y especializada.

1.2.1. Neuroanatomía de la corteza cerebral

La corteza cerebral constituye el nivel superior en la organización jerárquica del sistema nervioso. La estructura de la corteza es laminada. En el 95% de la corteza se han descrito seis capas (**Fig. 4**). Dichas capas son, desde la superficie hacia la profundidad:

- 1) Capa molecular o plexiforme, caracterizada por la presencia de pocas células.
- 2) Capa granulosa externa o de las pequeñas piramidales.
- 3) Capa de células piramidales.
- 4) Capa granulosa interna con predominio de células estrelladas.
- 5) Capa ganglionar o de grandes piramidales.
- 6) Capa de células fusiformes o polimórficas.

La corteza de seis capas constituye el neocórtex o neopalio.

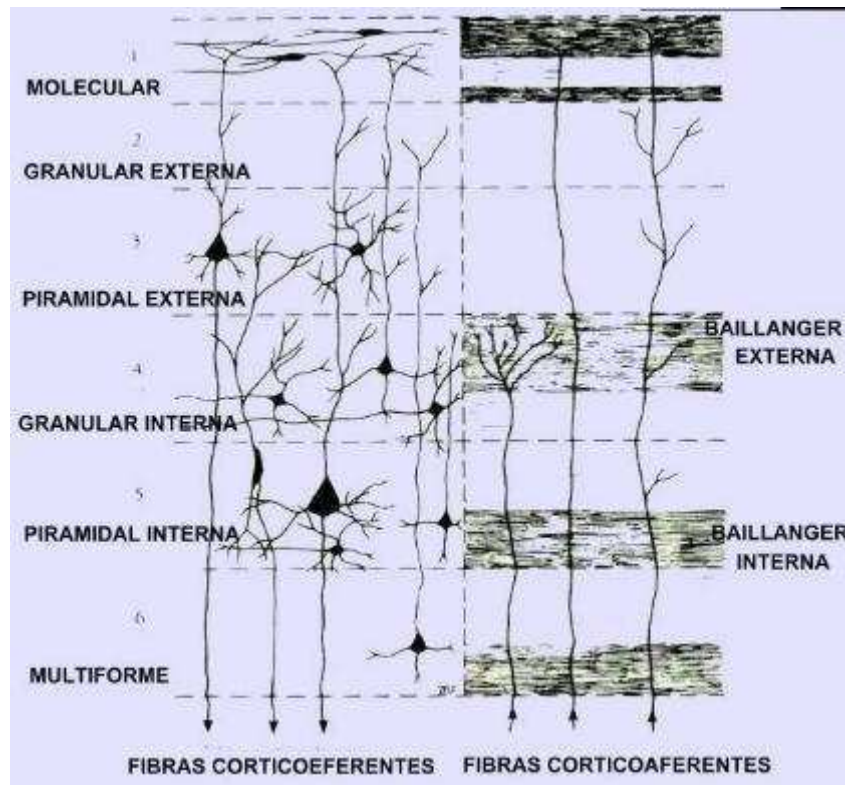


Figura 4. Representación de las capas de la corteza cerebral. Tomado de sites.google.com

Además de la organización laminar hay que considerar la organización columnar de la corteza. Las células están dispuestas en columnas que abarcan todo el espesor cortical y que integran una unidad funcional elemental. Las células de una columna están vinculadas entre sí por axones dispuestos longitudinalmente.

1.2.2. NEURONA

Ya hace tiempo que las neuronas fueron señaladas como las responsables de transmitir las señales en el sistema nervioso. Estas células, que constituyen parte del parénquima nervioso, presentan ciertas peculiaridades estructurales. En ellas pueden distinguirse un cuerpo neuronal o soma y dos tipos de prolongaciones, las dendritas y los axones. Según el número y la distribución de éstos, se las llamará neuronas unipolares, bipolares o multipolares.

Actualmente se admite que la forma de una neurona expresa su función. Y no podría ser de otra manera dada la forma ordenada y específica como se interconectan las neuronas.

1.2.2.1. Soma

El cuerpo neuronal o soma neuronal en realidad ocupa un volumen relativamente pequeño comparado con el total de la célula, debido al gran desarrollo de sus procesos dendríticos y axónico. El soma es un centro metabólico y de importante síntesis proteica. En su estructura, además de componentes celulares como el núcleo, el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y las mitocondrias, se encuentran los neurofilamentos, neurotúbulos y microfilamentos que constituyen el citoesqueleto, una verdadera red de comunicación en todo el citoplasma.

1.2.2.2. Dendritas

Son prolongaciones citoplasmáticas que parten del soma, se ramifican dicotómicamente y van disminuyendo su diámetro a medida que se alejan del soma. La función de las dendritas es básicamente recibir información de otras neuronas o del medio externo y transmitirla hacia el soma neuronal. Las hay de diversos tipos: rectas o muy sinuosas, largas y cortas, muy o poco ramificada. Las dendritas pueden o no presentar las espinas dendríticas, que son pequeñas prolongaciones sobre las cuales tienen lugar las típicas sinapsis axodendríticas. Las espinas son pequeñas dilataciones que en su interior contienen el aparato espinoso, formado por cisternas aplanadas, filamentos de actina y proteínas que forman la densidad postsináptica.

Árbol dendrítico

Las dendritas presentan extensas ramificaciones llamadas arborizaciones dendríticas. Las arborizaciones dendríticas aumentan significativamente la extensión de la superficie receptora de una neurona. La forma del *árbol dendrítico* está directamente relacionada con la función de la célula, ya que demarca el campo de recepción de impulsos de la neurona.

Dendrita primaria

Se denomina dendrita primaria a aquellas dendritas que nacen del soma neuronal.

Dendrita secundaria

Se llama dendrita secundaria a aquellas dendritas que se forman a partir de ramificaciones de las dendritas primarias.

1.2.2.3. Axón

La función principal del axón es transmitir información de manera centrífuga, o sea desde el soma de una neurona hacia otra neurona o hacia una célula efectora, como una célula muscular.

Cada neurona tiene un sólo axón, pero los ejemplos de axones que se ramifican no son difíciles de encontrar entre las raíces sensitivas, las células ganglionares simpáticas y las neuronas más pequeñas del SNC en general.

El axón emerge del ápice de una pequeña dilatación del soma, llamada cono axónico. Su diámetro es delgado y se mantiene por largas distancias hasta alcanzar las subdivisiones preterminales, el teledendrón. En el botón sináptico, porción terminal del axón, hay abundantes mitocondrias y vesículas sinápticas que contienen el neurotransmisor. En la zona del contacto sináptico, existe una zona muy electrondensa a nivel ultraestructural que corresponde a la grilla presináptica.

El contenido citoplasmático del axón, axoplasma contiene abundantes neurotúbulos paralelos al eje del axón, neurofilamentos, mitocondrias, neurofilamentos y vesículas.

El axón presenta, en algunos tipos neuronales varicosidades a lo largo de su trayecto, correspondiendo a zonas de liberación de neurotransmisor contenido en las vesículas

1.2.3. SINAPSIS

La sinapsis es un sitio de interacción entre dos células especializadas para la transmisión del impulso nervioso desde una neurona (presináptica) hacia otra (postsináptica). Las sinapsis también se producen entre axones y células efectoras (dianas) como las fibras musculares y las células glandulares. Las sinapsis entre neuronas pueden clasificarse morfológicamente en:

- Axodendríticas, que ocurren entre axones y dendritas;
- Axosomáticas, que se producen entre axones y el soma neuronal
- Axoaxónicas, que ocurren entre axones y axones.

Aunque menos abundantes, existen también sinapsis dendrodendríticas, dendrosomáticas, somatodendríticas y somatosomáticas.

Las sinapsis se clasifican en químicas y eléctricas.

En las sinapsis eléctricas la hendidura sináptica es pequeña (3,5 nm) y la corriente generada por el potencial de acción en la neurona presináptica fluye directamente a la célula postsináptica a través de canales que en su conjunto constituyen uniones comunicantes o en hendidura (*gap junctions*). Los canales iónicos están formados por un par de cilindros denominados conexones, uno que atraviesa la membrana plasmática presináptica y otro la postsináptica. Ambos se hallan en contacto entre sí y cada uno está formado por seis moléculas de conexina. La conductancia de los canales puede ser modulada por variaciones del pH, del Ca^{2+} citoplasmático o del voltaje y por fosforilaciones dependientes de quinasas evocadas por segundos mensajeros. Las sinapsis eléctricas permiten el envío de señales despolarizantes en forma bidireccional y la sincronización de neuronas interconectadas. Sin embargo, la transmisión eléctrica no es exclusiva del sistema nervioso, ya que también se la encuentra en el miocardio, el músculo liso y el hígado.

En las sinapsis químicas no hay continuidad estructural entre la membrana presináptica y la postsináptica, la hendidura sináptica es más ancha (20-40 nm); el terminal presináptico posee vesículas sinápticas con moléculas de neurotransmisor. El potencial de membrana provoca la liberación del contenido de las vesículas sinápticas en el espacio sináptico en respuesta al aumento de Ca^{2+} que tiene lugar con la llegada de cada potencial de acción axónico. El neurotransmisor se une a receptores en la membrana plasmática postsináptica y regula directa o indirectamente la apertura de canales iónicos. Según el tipo de receptor se originará una excitación o una inhibición, lo cual dependerá del receptor y no del transmisor. En general se produce un retraso de 0,3 msec. Pese a la lentitud que tienen en comparación con las sinapsis eléctricas, las sinapsis químicas poseen la propiedad de amplificación. Dado que una pequeña cantidad de moléculas de neurotransmisor son capaces de activar a un receptor, la descarga de una vesícula activa a muchos miles de moléculas, lo cual genera la apertura de miles de canales iónicos que son capaces de despolarizar a una célula postsináptica grande.

Así, en contraste con las sinapsis eléctricas, las sinapsis que usan la transmisión química pueden mediar acciones excitatorias o inhibitorias, son más flexibles y tienden a

producir comportamientos más complejos. Como pueden cambiar su efectividad, poseen una plasticidad que es importante para la memoria y otras funciones superiores del cerebro.

1.2.3.1. Sinaptofisina

La sinaptofisina es una proteína de las vesículas sinápticas con cuatro dominios transmembranas de PM 38 KDa, miembro de una familia de fosfoproteínas que se encuentran en la membrana presináptica y regulan la liberación de neurotransmisores (Theil, 1993).

Está presente en células neuroendocrinas y en prácticamente todas las neuronas del cerebro y de la médula espinal participando en la transmisión sináptica. Se utiliza como un marcador de tumores neuroendocrinos, y su ubicuidad en la sinapsis ha llevado al uso de la inmunotinción de sinaptofisina para la cuantificación de las sinapsis (Calhoun y col., 1996)

La función exacta de la proteína es desconocida se sabe que interactúa con la proteína de la vesícula sináptica esencial sinaptobrevina, pero cuando el gen de sinaptofisina se inactiva en animales de experimentación, estos pueden desarrollarse y funcionar normalmente (McMahon y col., 1996). Investigaciones recientes han demostrado, sin embargo, que la eliminación de sinaptofisina en ratones crea cambios en el comportamiento, tales como aumento en la conducta exploratoria, deterioro en el reconocimiento de objetos novedosos, y reducción en el aprendizaje espacial (Schmitt y col., 2009).

1.2.3.2. PSD-95

PSD-95 (proteína de densidad postsináptica 95) también conocida como SAP-90 (proteína asociada a la sinapsis 90) es una proteína anclaje postsináptico de PM 95 KDa que recluta componentes para la señalización en la sinapsis (Kim y Sheng, 2004) y promueve la maduración de las espinas dendríticas (El-Husseini y col., 2000a; 2000b).

PSD-95 es un miembro de la familia guanilato quinasa asociada a membrana (MAGUK). Es reclutada junto a PSD-93 en los receptores NMDA y canales de potasio. Estas dos proteínas MAGUK pueden interactuar en sitios postsinápticos para formar un andamio multimérico para el agrupamiento de receptores, canales iónicos y proteínas de señalización. Se encuentra casi exclusivamente en la densidad post sináptica de las

neuronas, (Hunt y col., 1992) y está implicada en el anclaje de las proteínas sinápticas. Sus compañeros de unión directos e indirectos incluyen neuroligin, los receptores NMDA, AMPA, y los canales de potasio (Sheng y Sala, 2001).

1.2.4. EL CITOESQUELETO NEURONAL

El citoesqueleto de la neurona está compuesto por tres elementos principales:

- los microtúbulos (MTs), formados por 13 protofilamentos de α - y β -tubulina que determinan una estructura hueca; también llamados neurotúbulos (NTs) en las neuronas.

- los filamentos intermedios (FIs) o neurofilamentos (NFs).

- los microfilamentos (MF), formados fundamentalmente por actina.

1.2.4.1. La proteína asociada a microtúbulos de tipo 2 (MAP-2)

Además de las proteínas que forman a los NTs, los FIs y los MFs existe todo un gran grupo de proteínas que se unen, principalmente, a los MTs frecuentemente se las llama **proteínas asociadas a MTs** (MAPs, por las siglas en inglés de *microtubule associated proteins*). Todos los miembros de las MAPs se unen a los MTs y, al hacerlo, promueven su ensamblaje y estabilizan su estructura. De los varios tipos existentes de MAPs, la MAP-2 es especialmente importante en relación al presente trabajo.

La MAP-2 se expresa en gran cantidad en el SNC aunque también se la encuentra en otros tejidos. Dentro del SNC, las MAP-2 de alto PM (HMWMAP-2) se expresan específicamente en las neuronas, en somas y dendritas, asociadas principalmente a los MTs y en co-localización con la actina en las espinas dendríticas y en las densidades postsinápticas (Tucker y col., 1988; Albala y col., 1995); pueden estar presentes en el axón pero sólo en pequeñas cantidades, a punto tal que, en general, *a la inmunomarcación específica para la MAP-2 se la utiliza habitualmente como marcador de dendritas*. Las MAP-2 de bajo PM (LMWMAP-2), en cambio, tienen una distribución más generalizada dentro de los distintos compartimientos celulares de las neuronas y se las puede encontrar también en las células de la glía (aunque en menor proporción).

Se postula que la MAP-2 cumple, entre otras, con las siguientes funciones: i) está implicada (y puede ser esencial) en el brote y crecimiento de las neuritas y en el establecimiento de la polaridad celular en las neuronas inmaduras, y en su mantenimiento en las maduras; ii) interactúa con los MTs y, al hacerlo, incrementa su rigidez, los estabiliza y da origen a polímeros microtubulares más largos; iii) estimulan la formación de haces microtubulares (no se sabe bien aún por cuál mecanismo, si por la unión cruzada de los MTs por medio de la dimerización de la MAP-2 y/o por la rigidez inducida en los MTs; iv) puede intervenir en (y regular) el transporte microtubular de organelas mediado por proteínas motoras de manera diferencial en axones y dendritas; v) los cambios en sus niveles acompañan a las modificaciones sinápticas y, por lo tanto, a las modificaciones en los circuitos sinápticos; vi) sus ciclos de fosforilación y desfosforilación acompañan la dinámica sináptica (el establecimiento, la consolidación y la modificación de las sinapsis) (Sánchez y col., 2000).

1.2.5. Tipos de neuronas corticales

En la corteza cerebral existe una amplia diversidad de tipos neuronales cuya clasificación todavía está sometida a debate (revisado en DeFelipe y col., 2005). Utilizando el método de Golgi (Golgi, 1873), Cajal clasificó las neuronas corticales como células de axón largo y células de axón corto (Cajal, 1892; revisado en DeFelipe, 2002). Desde entonces, se utilizan los términos de células de axón largo o de proyección, para designar a las células piramidales, y células de axón corto o interneuronas, que corresponden a las células no piramidales. En la actualidad, se conoce una gran diversidad de tipos neuronales corticales que se dividen, en general, según la presencia o no de espinas dendríticas. Las neuronas con espinas incluyen a las células piramidales y las células estrelladas con espinas. Las neuronas piramidales constituyen el tipo neuronal más abundante de la corteza, representan el 70-85% de la población neuronal total, se localizan en todas las capas corticales excepto en la capa I y son virtualmente las únicas neuronas de proyección de la corteza. Las células estrelladas con espinas son, con algunas excepciones, células de axón corto (interneuronas) confinadas principalmente a las capas medias, y presentan diferentes morfologías dependiendo de la especie y área cortical (Fairén y col., 1984; Lund, 1984). Por el contrario, las neuronas sin espinas, o con escasas espinas, representan un 15-30% de la población neuronal, constituyen un grupo muy heterogéneo de células de axón corto o interneuronas y están presentes prácticamente en todas las capas y regiones corticales.

1.3. MUERTE CELULAR

1.3.1. Tipos y clasificación

Existen varios criterios sobre los cuales la muerte celular puede ser clasificada. Según su morfología, según si ocurre de forma regulada o accidental, si es programada o no, según la participación de vías moleculares específicas, o si es fisiológica o patológica. En general las formas de muerte que presentan alguna de las siguientes características: regulada, programada o fisiológica, son asociadas generalmente con apoptosis; accidental, no programada o patológica son asociadas con necrosis. La realidad en materia de clasificación es realmente más compleja.

1.3.1.1. Según la morfología

Hasta hace pocos años, las descripciones ultraestructurales se consideraron como el criterio último para identificar los tipos de muerte celular. En base a este criterio se distinguen en la actualidad tres tipos principales: necrosis, apoptosis y autofagia (Lossi y Merighi, 2003; Kroemer y col., 2009).

La **necrosis** se caracteriza no sólo por cambios nucleares sino también por alteraciones en la membrana plasmática y otras organelas. En el núcleo la cromatina se condensa (picnosis) en múltiples agregados de distinta densidad y forma irregular (Kerr y col., 1995). Durante el proceso de necrosis, la célula suele hincharse (edema) y las organelas presentar daño estructural. Las mitocondrias sufren cambios que incluyen contracción de la membrana interna o externa, formación de agregados y desintegración (Trump y col., 1965). Los ribosomas se separan del RER y los polirribosomas se desasocian, dando como resultado la presencia de ribosomas libres en el citosol, de forma que la matriz citosólica parece densa y granulada. Las cisternas del RE y del Golgi pueden dilatarse, fragmentarse y formar vesículas, mientras que la membrana plasmática puede perder su integridad o sufrir un proceso denominado *blebbing* (Laiho y col., 1971; Kerr y col., 1995). En inglés *bleb* significa burbuja o vesícula, y a diferencia de *budding* –ver más adelante–, el proceso se caracteriza por formación de protrusiones circulares de membrana plasmática de tamaño pequeño que no contienen organelas, las cuales pueden separarse de la célula o estallar (Majno y Joris, 1995).

La **apoptosis** presenta un fenotipo morfológico distintivo. En la mayoría de las descripciones clásicas de apoptosis, los cambios tempranos definitivos ocurren dentro del

núcleo (Kerr y col., 1972; Wyllie y col., 1980). La cromatina se condensa en masas densas con bordes bien definidos, las cuales suelen estar contra la membrana nuclear, o dispuestas circularmente en el núcleo. La desintegración del nucléolo ocurre temprano, y las alteraciones en el citoplasma acompañan a estos cambios nucleares. El citoplasma se condensa, observando como un oscurecimiento de la célula, y consecuentemente la célula se reduce en tamaño, mientras que la membrana plasmática permanece intacta. La condensación del citoplasma frecuentemente se asocia con la aparición de vacuolas translúcidas (Kerr y col., 1995). El origen de estas vacuolas no se conoce, pero podrían derivar del retículo endoplasmático o del complejo de Golgi (Portera-Cailliau y col., 1997). Durante el curso de estos eventos, las mitocondrias típicamente se encuentran intactas (Kerr y Harmon, 1991), y son requeridas para la apoptosis (Newmeyer y col., 1994). Luego, la célula sufre un proceso denominado *budding*. En este proceso el núcleo que contiene masas uniformes de cromatina condensada, se fragmenta junto con porciones de citoplasma, formando residuos celulares (debris) o cuerpos apoptóticos, compuestos por porciones de núcleo rodeado de citoplasma con organelas, en algunos casos intactas (Majno y Joris, 1995). Algunos fragmentos nucleares pueden estar contenidos por membranas, mientras que otros no. Estos cuerpos luego son fagocitados por células cercanas o típicamente fagocitos.

La **autofagia** presenta una formación masiva de vacuolas denominadas autofagosomas. Estos tienen doble membrana y pueden contener tanto organelas como citosol (Levine y Klionsky, 2004). Típicamente la cromatina no presenta condensación y estas células no son fagocitadas por células cercanas ni fagocitos (Clarke, 1990). Actualmente se considera que la autofagia no es un tipo de muerte, ya que la inhibición de la fusión del autofagosoma con el lisosoma no logra detener el proceso de muerte (Galluzzi y col., 2012).

Estas descripciones corresponden al modelo ideal de cada morfología. Dependiendo del estímulo y la estructura o el contexto (*in vivo* o *in vitro*), se presentan variaciones que pueden coincidir en mayor o menor medida con estos modelos, formando así un amplio espectro de fenotipos. Dado que los cambios morfológicos son consecuencia de un proceso molecular subyacente, es de esperar que pequeños cambios moleculares alteren el fenotipo de muerte.

1.3.1.2. Muerte regulada o accidental

El otro criterio clasificador es si la muerte es ejecutada por un mecanismo enzimático interno o por factores externos a la célula (osmóticos, termales, tóxicos o traumáticos). En el primer caso la muerte es regulada: el proceso que conduce a la muerte puede ser inhibido por intervención farmacológica o génica (Galluzzi y col., 2012). En el segundo, la muerte es accidental, y la muerte no puede ser detenida por ninguna intervención. La apoptosis es un mecanismo de muerte regulada (depende de caspasas o de factores liberados por la mitocondria), mientras que la necrosis se presenta en casos de muerte accidental, aunque existen ciertos casos de muerte con morfología necrótica que son regulados (Van-denabeele y col., 2010).

1.3.1.3. Muerte Celular Programada

Otro criterio que ha traído confusión es el de muerte celular programada, término que se utiliza como sinónimo de apoptosis. Apoptosis se refiere a un mecanismo de muerte celular, mientras que muerte celular programada se refiere al proceso de muerte que ocurre en un momento dado del desarrollo o durante la homeostasis tisular (Alles y col., 1991; Majno y Joris, 1995; Lossi y Merighi, 2003). Es cierto que la mayoría de la muerte celular programada ocurre por mecanismos apoptóticos, aunque no en todos los casos (Schwartz y col., 1993). Para evitar estos malentendidos surgieron términos alternativos a muerte celular programada, como muerte celular que ocurre naturalmente (en inglés: NOCD) (Lossi y Merighi, 2003) o muerte celular propia del desarrollo (MCPD).

1.3.1.4. Muerte Fisiológica o Patológica

Por último, la relación patológica-necrosis y fisiológica- apoptosis está muy lejos de ser cierta. Es común observar ambos fenotipos o una mezcla de ambos en tumores y otras patologías (Leist y Jäätelä, 2001; Benn y Woolf, 2004); mientras que fisiológicamente la necrosis podría tener un rol importante en el mantenimiento de tejidos (Zong y Thompson, 2006; Han y col., 2008).

1.3.2. La muerte necrótica

El principal estímulo que puede generar una muerte necrótica en el SNC es el que se produce en fenómenos de isquemia y excitotoxicidad. La excitotoxicidad es una condición patológica que ocurre en una variedad de alteraciones neurológicas tales como hipoxia, hipoglucemia o agresiones celulares y que describe una sobreestimulación de

subtipos concretos de receptores de glutamato como los NMDA. Estos son receptores ionotrópicos que actúan como canales de Ca^{2+} ligando-dependientes y que de su activación prolongada resulta un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular, la generación de especies reactivas de oxígeno y la muerte celular (Choi, 1995). Se han encontrado evidencias que en estos procesos de excitotoxicidad e isquemia podrían participar proteínas (Bax y Bcl-2, entre otras) que anteriormente se pensaba que solo actuaban en procesos de muerte programada (Martinou y col., 1994; Miller y col., 1997). Estas evidencias sugieren que reguladores clave de la muerte apoptótica también podrían estar implicados en la muerte neuronal asociada excitotoxicidad-isquemia. Algunos mecanismos de esta muerte necrótica son similares a esos otros que forman parte de la muerte neuronal programada, indican que, aquello que hace años hacía pensar en procesos de muerte totalmente diferentes a nivel conceptual y bioquímico, podrían estar más o menos relacionados. Es el caso complejo de la excitotoxicidad que dependiendo de la contribución de los receptores de las diferentes subpoblaciones podría ser relevante en la decisión del modo de muerte donde una masiva estimulación de los receptores de glutamato por glutamato exógeno puede rápidamente desencadenar necrosis.

En este tipo de muerte tienen especial relevancia las especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species; ROS). Estas ROS se generan habitualmente durante la respiración celular en la mitocondria. Pero cuando se producen situaciones anormales en el funcionamiento de ésta debido principalmente, en procesos necróticos, a una situación de estrés metabólico se produce un gran incremento en su concentración. Al verse incrementada la concentración de éstas haciendo imposible la detoxificación por las sustancias antioxidantes presentes en las células y los mecanismos de la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa, se produce una serie de eventos en cascada como la formación de radicales derivados del óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO^-) y la oxidación de lípidos de membrana produciendo daños importantes en su estructura y oxidación de proteínas, que como resultado final, dan lugar a la lisis de la célula y liberación del contenido al espacio extracelular.

1.3.3. La apoptosis

Desde que fue descrita la apoptosis por Kerr y colaboradores en 1972, es uno de los procesos más investigados en la biología. Al ser un proceso altamente selectivo, es importante tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La apoptosis tiene como función biológica principal mantener la homeostasis en distintas poblaciones celulares. La desregulación de este proceso puede conducir a estados patológicos que involucran a enfermedades con excesiva acumulación celular (bajo nivel de apoptosis) o con excesiva pérdida celular (alto nivel de apoptosis).

1.3.3.1. Las caspasas: el principio del fin

El nombre caspasa es una contracción de cisteína-dependiente aspartato-específica proteasa (Alnemri y col., 1996). Son unas proteasas altamente conservadas a lo largo de la evolución (desde el nematodo, pasando por insectos hasta humanos). Estas proteínas contienen tres dominios funcionales: un predominio N-terminal, una subunidad mayor que contiene el centro activo formado por una cisteína dentro de un motivo altamente conservado, QACXG, y una subunidad pequeña en el C-terminal (Stennicke y Salvesen, 1998). Se han identificado 14 caspasas diferentes en mamíferos (Van de y col., 1998), formadas por dos subfamilias biológicas distintas: una de ellas participa en el procesamiento de citoquinas proinflamatorias, y la otra es necesaria para iniciar y ejecutar la respuesta apoptótica durante la muerte celular programada.

Para permitir el latente programa apoptótico en respuesta a las diferentes señales de muerte, las caspasas se sintetizan en forma de zimógenos (procaspasas) estado en el cual se mantienen inactivas. Estos zimógenos están compuestos de tres dominios: un prodominio N-terminal, y los dominios p20 y p10 (**Fig. 5**) que formarán la enzima madura. En la mayoría de los casos examinados, la enzima madura está formada por un heterotetrámero que contiene dos p20/p10 heterodímeros y dos centros activos (Earnshaw y col., 1999, Hengartner, 2000).

Existen tres mecanismos de activación de las caspasas: la activación por otra caspasa, la activación inducida por proximidad y la activación dependiente de la asociación con una subunidad reguladora.

La activación de caspasas por otras caspasas en la cascada de activación se realiza mediante la proteólisis del zimógeno entre los dominios p20 y p10 y también habitualmente entre el prodominio y el dominio p20 (**Fig. 5a**).

Esta estrategia de activación se usa ampliamente por las células para la activación de las tres procaspasas de prodominio corto, caspasa-3, -6 y -7. Estas tres caspasas son consideradas el "caballo de batalla" de la familia de las caspasas y son normalmente más abundantes y activas que las de prodominio largo. La activación de caspasas inducida por proximidad, propone que bajo condiciones de elevado número de moléculas de procaspasa reclutadas debido a un estímulo concreto y en gran concentración local de zimógeno, la actividad proteasa intrínseca de la proteína es suficiente para permitir que varias moléculas de proenzima se proteolisen mutuamente activándose unas a otras (**Fig. 5b**). Este mecanismo es el que se propone para la activación de la caspasa-8 (Muzio y col., 1998), -2 y la caspasa de nematodo CED-3 (Yang y col., 1998). La activación dependiente de asociación con una subunidad reguladora es el sistema de activación más complejo y es el usado por la caspasa-9. A diferencia de las anteriores caspasas, el procesamiento de la procaspasa-9 tiene una menor incidencia en la actividad catalítica de la enzima. La clave está en el requerimiento de la asociación con un cofactor proteico, Apaf-1. Una de las dos proteínas que forma el complejo proteico necesario para su activación conjunta con otra proteína, citocromo *c* (Li y col., 1997) y que con la procaspasa-9 forman una holoenzima llamada apoptosoma que permite la activación de la caspasa (**Fig. 5c**). Esta holoenzima es un complejo proteico que puede contener más proteínas adicionales (Cain y col., 1999).

A nivel funcional, en la apoptosis, las caspasas las podemos clasificar en dos grupos: las iniciadoras, que serían aquellas que iniciarían la cascada de activación de las caspasas y que tienen como función activar a otras caspasas como por ejemplo la caspasa-8, -9,-10 y -2 en mamíferos, y las caspasas ejecutoras que son aquellas activadas por las iniciadoras, que actúan directa y selectivamente sobre una serie de sustratos apoptóticos concretos, activando o inactivándolos y que dará como resultado el desarrollo de las características morfológicas comentadas anteriormente. Estas son la caspasa-3, -7 y -6 en mamíferos. En resumen, las caspasas efectoras son normalmente activadas proteolíticamente por caspasas situadas corriente arriba en la cascada de activación, mientras que las iniciadoras son activadas a través de interacciones proteína-proteína reguladora.

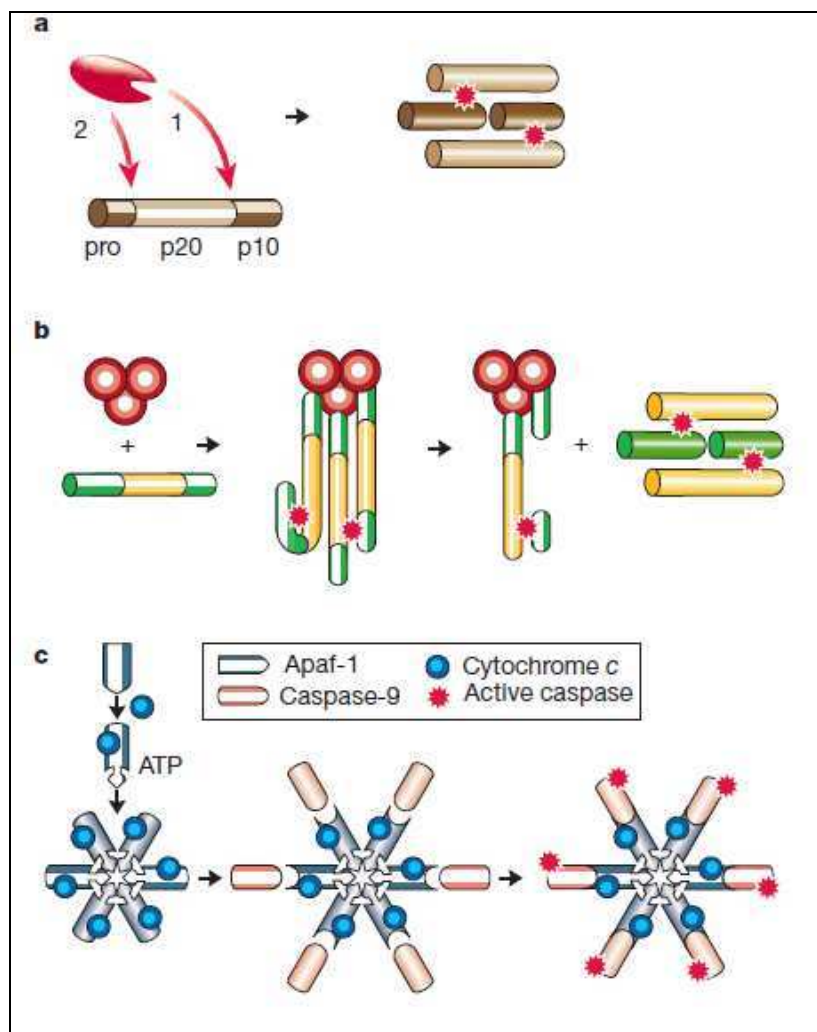


Figura 5. Diferentes mecanismos de activación de caspasas. Los mecanismos de activación de las caspasas incluyen (a) acciones proteolíticas por caspasas situadas por encima de la cascada de activación, (b) la activación inducida por proximidad y (c) la formación de una holoenzima. Esquema extraído de Hengartner, 2000.

No todas las caspasas identificadas tienen un papel relevante en la muerte apoptótica y los mecanismos moleculares que implican la activación de caspasas todavía permanecen poco claros. Aunque también a muchas de las caspasas que se conocían se les empiezan a descubrir nuevas funciones implicadas en el suicidio celular, como es el caso de la caspasa-12. Inicialmente descrita en su implicación en procesos inflamatorios, actualmente se le atribuye un papel importante en la activación de procesos apoptóticos en nuevos mecanismos moleculares descritos que inducen muerte celular programada por estrés reticular (Gu y Spitzer, 1995; Nakagawa y col., 2000), que puede ser causado por una acumulación de proteínas mal plegadas o una desregulación de la homeostasis del calcio (Ferri y Kroemer, 2001).

1.3.3.2. Dos caminos, un destino: las dos principales vías apoptóticas en células de mamífero

La regulación de esas interacciones proteína-proteína es uno de los temas más importantes en el estudio de la apoptosis y sus vías de actuación. Los mecanismos exactos que ocurren desde que se recibe un estímulo hasta que se desencadenan los diferentes eventos en el núcleo celular todavía siguen siendo un misterio. Estas diferentes vías de activación de la apoptosis por caspasas no pueden dibujarse independientemente ya que las diferentes piezas que se conocen y que forman diversas vías se interconectan y una vía puede ser regulada por proteínas de otra vía con las que interaccionan. Las dos principales vías apoptóticas de células de mamífero son la vía extrínseca y la vía intrínseca.

La vía extrínseca se inicia con la activación de un tipo de receptores de membrana llamados receptores de muerte. Hay diferentes tipos de receptores de muerte en diferentes tejidos, pero se ha demostrado que dos miembros de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR, *tumor necrosis factor receptor*) están implicados en la muerte neuronal (Nagata, 1997; Raoul y col., 2000): Fas (CD95/Apo-1) y el receptor de neurotrofinas p75 (p75^{NTR}). La unión del ligando con el receptor provoca la agrupación de receptores de muerte formando un complejo que inicia la señalización de inducción de muerte (ver figura 5). Este complejo recluta, mediante la molécula adaptadora FADD (*Fas-associated death domain protein*), múltiples moléculas de procaspasa-8, dando lugar a su activación en caspasa-8 debido a la activación por proximidad (Miller y col., 1997) (**Fig. 6**).

Una vez activada la caspasa-8 se pueden suceder diversas acciones. Como caspasa iniciadora puede actuar sobre otras caspasas como la caspasa-3, -6 y -7 proteolizándolas y activándolas (Srinivasula y col., 1996). Algunos autores sugieren que como caspasa iniciadora también podría traslocar al núcleo celular y proteolizar diversos sustratos apoptóticos como la poli (ADP-ribosa) polimerasa (*poly(ADP-ribose) polymerase*, PARP) (Benchoua y col., 2002) juntamente con alguna otra caspasa ejecutora, como la caspasa-3. Otra de las acciones de la caspasa-8 en esta vía extrínseca sería la de activar indirectamente la otra gran vía apoptótica, la vía intrínseca. Esta vía es la señal apoptótica que va mediada a través de la mitocondria. Esta interacción e integración entre la vía del receptor de muerte y la vía mitocondrial se realiza gracias a la acción de la caspasa-8 sobre la proteína Bid, una proteína proapoptótica de la familia de Bcl-2. La caspasa-8 proteoliza a Bid, esta proteína Bid

truncada se transloca a la mitocondria, donde promueve la liberación de citocromo c dando lugar a la activación de la vía intrínseca (Sun y col., 1999).

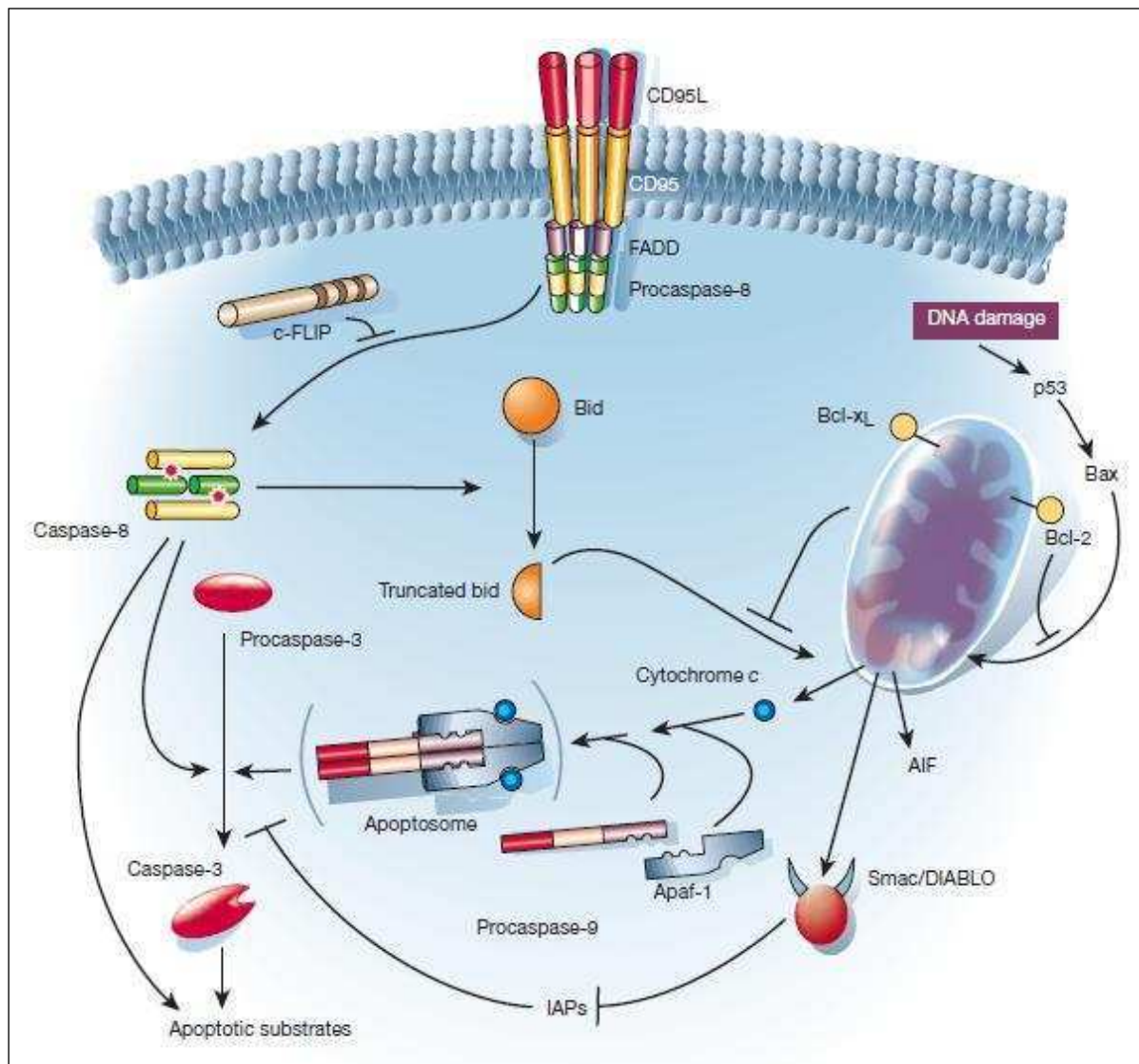


Figura 6. Las dos principales vías apoptóticas en células de mamífero. La vía extrínseca o del receptor de muerte (a la izquierda de la figura) se dispara a través de los receptores de la superfamilia de los receptores de muerte iniciando la cascada activando la caspasa-8. La vía mitocondrial (a la derecha de la figura) se activa en respuesta a múltiples estímulos, desde lesiones en el ADN hasta la activación cruzada vía caspasa-8 y BID, promoviendo la activación de la caspasa-9. Ambas vías confluyen en la activación de la caspasa-3 ejecutora que actuaría sobre los diferentes sustratos apoptóticos. Esquema extraído de Hengartner, 2000.

Mientras que en el inicio de la muerte apoptótica vía receptor de muerte intervienen relativamente un pequeño número de ligandos estructuralmente relacionados, la vía mitocondrial o intrínseca puede ser disparada en neuronas por una gran variedad de agentes no relacionados estructuralmente (Sastry y Rao, 2000). Esto

implica que la apoptosis mitocondrial puede ser inducida por algo más que un simple mecanismo. Una de las claves para la vía intrínseca es la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol (**Fig.6**). Esta liberación está causada por una ruptura de la membrana mitocondrial externa y/o por la permeabilidad mitocondrial transitoria (MPT; *mitochondrial permeability transition*), y que está controlada por un poro sensible a voltaje y a calcio, comúnmente llamado poro de permeabilidad transitoria (PT; *permeability transition*) (Blatt y Glick, 2001). Una vez liberado el citocromo c al citosol se puede formar la holoenzima apoptosoma asociándose a la proteína adaptadora Apaf-1 que reclutaría a la procaspasa-9 a través de su dominio de reclutamiento de caspasas (*caspase recruitment domain*; CARD) activándola, en un proceso dependiente de energía en forma de ATP (**Fig.6**). Como comentamos anteriormente este complejo activaría la caspasa-9 cuya acción principal sería la activación de caspasas ejecutoras como la caspasa-3 o la -7.

La vía apoptótica dependiente de receptores de muerte y la mitocondrial convergen a nivel de la activación de la caspasa-3. Por debajo de esta caspasa ejecutora el programa de muerte apoptótica se ramifica en subprogramas de múltiples pasos la suma de los cuales da como resultado el desmantelamiento ordenado de la célula y la posterior eliminación. Estos fenómenos dan lugar a la aparición de las características fenotípicas de la apoptosis comentadas anteriormente. La caspasa-3 puede actuar sobre factores nucleares proapoptóticos activando directamente el factor de fragmentación del ADN (DFF; *DNA fragmentation factor*) (Liu y col., 1997), PARP (Nicholson y col., 1995; Tewari y col., 1995), o el complejo CAD (*caspase-activated Dnase*)-iCAD (*inhibitor of CAD*) (Enari et al., 1998). Estos sustratos actúan sobre el ADN degradándolo, en fragmentos que generan un patrón característico de secuencias repetidas de unos 200pb, punto de corte en el ADN a nivel del nucleosoma, también llamado *DNA laddering* (Compton, 1992). Pero no todos los sustratos de las caspasas son nucleares. Aunque los mecanismos no se conocen con exactitud, la externalización de la fosfatidilserina (PS) en los estadios iniciales de la apoptosis (Fadok y col., 1992) depende de la acción de diferentes caspasas (Martin et al., 1996) y es un parámetro ampliamente utilizado para determinar si se desencadena la muerte apoptótica y en qué grado se produce. Existen cientos de sustratos posibles para las caspasas, evidenciando la gran complejidad y magnitud del proceso apoptótico.

Y a pesar de esta gran complejidad en la actuación de las caspasas existe la posibilidad de parar sus acciones. Existen proteínas que son capaces de inhibir a estas caspasas impidiendo que desarrollen su capacidad de "matar" a la célula. Son las

proteínas inhibidoras de la apoptosis, las IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*). En las células de mamífero se han descrito hasta cinco tipos: NIAP, cIAP1, cIAP2, XIAP y survivin (Liston y col., 1996; Uren y col., 1996; Ambrosini y col., 1997; Duckett y col., 1998). Son proteínas capaces de inhibir la apoptosis inducida tanto por receptores de muerte como la inducida por miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2 o citocromo c (Deveraux y col., 1998; Deveraux y Reed, 1999) y que den lugar a la activación de las caspasas. La unión de las IAPs a dominios estructurales específicos, impiden que las caspasas puedan continuar con el programa de muerte celular (Roy y col., 1997).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis es analizar el daño que produce la exposición a EtOH en cultivos primarios de neuronas corticales y si ello depende del estadio de diferenciación neuronal.

Los objetivos específicos son:

I. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de EtOH sobre la viabilidad celular en cultivos primarios de neuronas de corteza cerebral de rata

II. Investigar si el efecto del EtOH varía según el estadio de diferenciación neuronal

III. Determinar el tipo de muerte celular que induce el EtOH

IV. Analizar el efecto del EtOH sobre el contenido proteico de proteínas apoptóticas

V. Estudiar si la exposición a EtOH produce cambios en la morfología neuronal

VI. Evaluar las alteraciones ultraestructurales producidas por la exposición a EtOH

MATERIALES

Y

METODOS

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Animales

Se utilizaron embriones de ratas de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*; Hsd: WI) de 1 a 4 días de vida. Los animales fueron adquiridos en el Bioterio Central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

3.1.1. Cuidado de los animales

Todos los procedimientos para el cuidado y el uso de animales de experimentación fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio del NIH, con los principios presentados en la Guía para Uso de Animales en Investigación en Neurociencias de la Society for Neuroscience. Se realizaron todos los esfuerzos necesarios para minimizar el sufrimiento de los animales y el número de animales utilizados fue el mínimo requerido para la interpretación estadísticamente significativa de los datos.

3.2. CULTIVOS CELULARES

3.2.1. Obtención de cultivos primarios de neuronas corticales

Los cultivos primarios neuronales se obtuvieron según lo descrito por Lopez Verrilli y col. (2009), utilizándose crías de ratas Wistar de un día de edad (DPN1). Luego de ser decapitadas, se disecó la corteza en solución fisiológica (NaCl 9 g/l). Después de extraer cuidadosamente las meninges, el tejido se disoció con una solución de papaína (18 U/ml) durante 30 min a 37°C. La reacción se detuvo por dilución con medio de cultivo D-MEM (pH= 7,4). Luego de centrifugar durante 5 min a 600 xg, se resuspendió el precipitado en D-MEM conteniendo DNAsa (0,01 mg/ml). Se dejó decantar el tejido no disociado, y el sobrenadante, que contiene las células, se centrifugó 5 min a 800 xg. Posteriormente las células fueron resuspendidas en medio selectivo para neuronas (Neurobasal suplementado con B-27) y luego sembradas en placas de cultivo pretratadas con poli-L-lisina 0,02%. Fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera gaseosa de 5% de CO₂ en aire hasta el comienzo de los tratamientos.

Todos los medios utilizados para la obtención y mantenimiento de los cultivos celulares contenían los siguientes antibióticos: 50 U/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomicina.

3.2.2. Caracterización de los cultivos primarios neuronales

Los cultivos neuronales se caracterizaron por inmunofluorescencia doble marcado utilizando un marcador neuronal (MAP-2) y un marcador de astrocitos (GFAP).

Las células se fijaron con paraformaldehído 4% en buffer fosfato salino (PBS) durante 15 min a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS. Se permeabilizaron con una solución compuesta por Tritón X-100 0,1% en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para evitar uniones inespecíficas, las células se incubaron con PBS conteniendo suero normal ovino 5% v/v durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Las células se incubaron con los anticuerpos anti MAP-2 de ratón (1/1000) + anti GFAP de conejo (1/1000) durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Antes de la incubación con los anticuerpos secundarios, las células se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min con agitación suave. Se utilizaron anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados con Texas Red y anticuerpos secundarios anti-conejo conjugados con Fluoresceína. La incubación con anticuerpos secundarios fue realizada en oscuridad, a temperatura ambiente durante 4 horas en buffer PBS. Luego se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS y los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos con medio de montaje *Fluoroshield* (Sigma). Los preparados se observaron utilizando un microscopio de epifluorescencia Zeiss AxioLab acoplado con una cámara digital (Olympus Qcolor3). Para determinar la posible unión inespecífica de los anticuerpos secundarios, se realizó el mismo experimento en ausencia de anticuerpos primarios. Las imágenes fluorescentes obtenidas se consideraron como control de señal inespecífica.

3.2.3. Tratamiento de los cultivos neuronales

El día de siembra de las células se consideró como el día *in vitro* 1 (DIV 1). Las células fueron mantenidas durante 7-15 días con los correspondientes cambios de medio. Un día antes de la realización de los protocolos experimentales, los cultivos neuronales se incubaron con Neurobasal en ausencia de B-27.

El tratamiento de los cultivos primarios se realizó en dos estadios de diferenciación neuronal: en el día *in vitro* 7 (DIV 7) y en el día *in vitro* 14 (DIV 14). Los

cultivos neuronales se incubaron con tres concentraciones crecientes de EtOH (25, 50 y 100 mM) durante 24 horas, luego se procesaron los cultivos dependiendo del experimento a realizar. El grupo control consistió en cultivos neuronales incubados con medio Neurobasal en ausencia de EtOH (**Fig.7**).

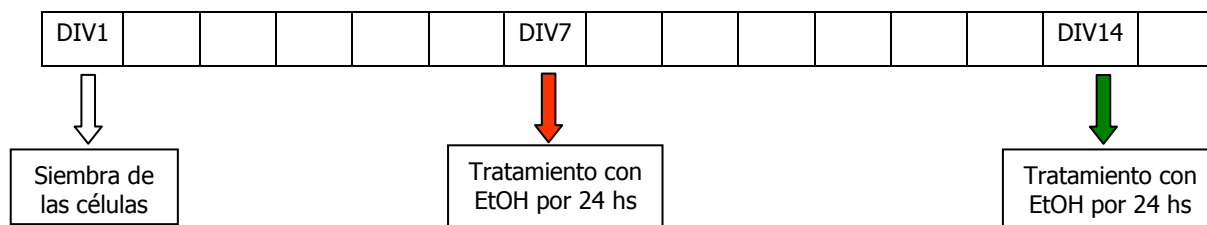


Figura 7: Esquema ilustrativo del modelo experimental.

3.3. ESTUDIO DE VIABILIDAD CELULAR

3.3.1. Ensayo de MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3,4-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a un compuesto coloreado de color azul, el formazán, por la actividad enzimática de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenada (Uludag y Sefton, 1990). Este método se utiliza para medir supervivencia y proliferación celular, ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (**Fig. 8**).

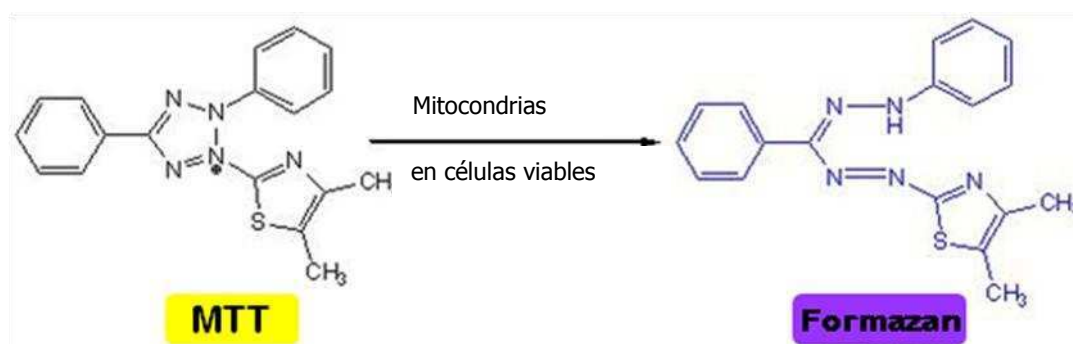


Figura 8: Esquema de la reducción del MTT.

Para la realización del ensayo se realizaron cultivos primarios como se describió en el apartado II.1., sembrándose 100.000 células/pocillo en placas multiwells de 96 pocillos

Después de 24 hs de tratamiento de los cultivos neuronales se realizó el siguiente protocolo:

- 1) Se adicionó 10 μ l de MTT (0,5 mg/ml PBS) a cada pocillo y se incubó durante 4 hs a 37°C para permitir la formación de los cristales de formazán.
- 2) Luego se descartó el sobrenadante, se adicionó 100 μ l de solución de HCl 0,01 M conteniendo SDS 10% y las células se dejaron a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazán se disolvieran (30 min aproximadamente).
- 3) La absorbancia se midió en un lector de microplacas en 600 nm.

3.4. ESTUDIOS DEL TIPO DE MUERTE CELULAR

3.4.1. Determinación del tipo de muerte celular por tinción con Bromuro de Etidio y Naranja de Acridina

Esta técnica permite la clasificación de los núcleos como viables, apoptóticos (tempranos y tardíos) o necróticos a través de la visualización celular por microscopía de fluorescencia.

El método se basa en la utilización simultánea de los colorantes naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BrEt). La NA es un colorante no vital que difunde a través de la membrana plasmática tanto en las células vivas como en las muertas y se intercala en las bases del ADN formando con este un complejo verde fluorescente. También se une al RNA, pero este se tiñe de una coloración rojo-anaranjado y tiene localización citoplasmática. El BrEt es un colorante vital que no puede atravesar la membrana plasmática, solo tiñe las células muertas que han perdido la integridad de su membrana plasmática. Al intercalarse esta molécula en el ADN forma un complejo fluorescente color anaranjado.

Para la realización de estos ensayos se sembraron $3,5 \times 10^6$ células en placas de Petri de 35mm de diámetro y se las incubaron a 37°C. Después de 24 hs de tratamiento se siguió el protocolo que aquí se detalla:

- 1) Se removió el medio de cultivo.
- 2) Se incubó con 1ml de una solución que contenía NA y BrEt (0.1mg/ml de cada una) en PBS a 37°C durante 5 min.

- 3) La sonda no incorporada se eliminó realizando dos lavados con PBS a 37°C.
- 4) Se montaron con cubres de vidrio y se tomaron imágenes en un rango de tiempo que no superó los 20 minutos con lámpara UV azul.

Cuantificación de nucleos viables, apoptóticos y necróticos: a partir de las imágenes obtenidas de los cultivos teñidos con BrEt/NA, con una magnificación de 10X, se analizó la morfología nuclear por microscopía de epifluorescencia. Se contaron por lo menos 200 células por muestra y se calculó el porcentaje relativo de células viables, apoptóticas y necróticas en cada una de ellas. Tal como se muestra en la siguiente figura, las células viables presentan núcleo verde brillante con estructura intacta, mientras que las células apoptóticas tempranas presentan núcleo verde brillante con condensación de la cromatina. Las células apoptóticas tardías presentan núcleo anaranjado con condensación de áreas densas anaranjadas y las células necróticas presentan núcleo anaranjado con estructura intacta (**Fig. 9**).

Los cultivos se fotografiaron con un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiolab acoplado con una cámara digital (Olympus Qcolor3). Las imágenes fueron analizadas con el software Image Pro Plus.

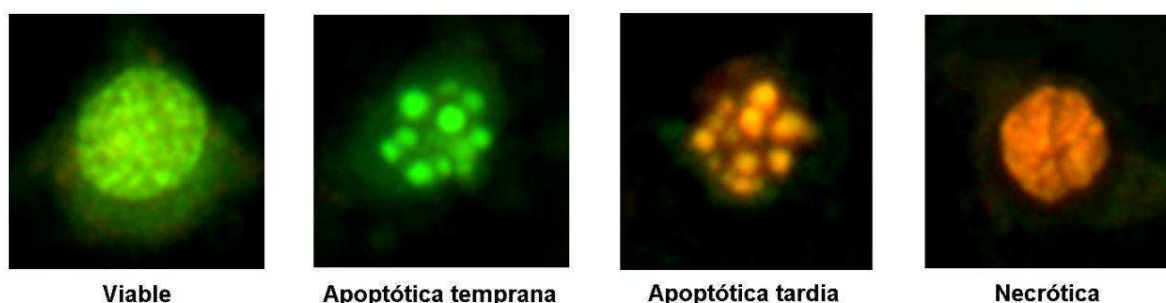


Figura 9: Imágenes de morfología nuclear obtenidas al teñir las células simultáneamente con NA y BrEt.

3.4.2. Estudio de apoptosis celular por la técnica de TUNEL y coloración con Hoechst 3342

El TUNEL es una técnica que permite determinar la fragmentación del ADN in situ. La activación de endonucleasas durante la apoptosis genera fragmentos de ADN con terminaciones 3'-OH libres. Este método emplea a la enzima deoxinucleotidil

transferasa terminal (TdT) para adosar deoxinucleótidos tri-fosfatos (dUTP) fluorescentes a los fragmentos de ADN con terminaciones 3'-OH libres.

El número de células marcadas depende de las condiciones experimentales utilizadas, por lo que es necesario utilizar conjuntamente otra técnica que permita identificar todos los núcleos presentes. Utilizando Hoescht 33258 pueden ser identificados por microscopía de fluorescencia los cambios de condensación y marginación de la cromatina que ocurre durante la apoptosis, pudiéndose detectar células viables y apoptóticas.

Para realizar el ensayo de TUNEL se utilizó un kit fluorométrico según las instrucciones del fabricante (Promega). Se sembraron $3,5 \times 10^6$ células en placas de Petri de 35mm de diámetro.

Los cultivos neuronales fueron tratados tal como se detalló en el apartado II.2 y luego se realizó el siguiente procedimiento:

- 1) Se fijaron los cultivos neuronales con paraformaldehído al 4% (PAF 4%) en PBS durante 20 min.

- 2) Se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS.

- 3) Se incubaron en buffer de equilibrio provisto por el kit durante 10 minutos, a temperatura ambiente.

- 4) Posteriormente se incubó con buffer de reacción (una solución que contenía: 50 μ l buffer de equilibrio / 5 μ l de mezcla de nucleótidos: dUTP conjugados con fluoresceína y ATP / 1 μ l de deoxinucleotidil transferasa terminal durante 1 hora a 37°C.

- 5) La reacción se detuvo con la solución SSC 2X, incubada por 15 minutos.

Se realizó una tinción con Hoescht 33342 (2 μ g/ml en PBS), en oscuridad, durante 5 minutos, a temperatura ambiente.

- 3) Se realizó un lavado con PBS.

- 4) Se montaron los preparados con 30% de Glicerol en PBS y se cubrieron con cubreobjetos.

- 5) Se almacenaron a 4 °C, en oscuridad, hasta su observación en un microscopio óptico de epifluorescencia. Los preparados fueron fotografiados en paralelo, manteniendo las mismas condiciones de luminosidad y tiempo de exposición para todos los tratamientos y el control.

Cuantificación del porcentaje de células TUNEL (+): a partir de las imágenes obtenidas de los cultivos a los que le realizamos la técnica de TUNEL, con una magnificación de 20X, se midió el porcentaje relativo de células apoptóticas en cada una de ellas. Se contaron por lo menos 200 células por muestra.

Los cultivos se fotografiaron con un microscopio de epifluorescencia Zeiss AxioLab acoplado con una cámara digital (Olympus Qcolor3). Las imágenes fueron analizadas con el software *Image Pro Plus*.

3.4.3. Análisis del efecto del EtOH sobre el contenido proteico de proteínas apoptóticas por ensayo de western blot

3.4.3.1. Obtención de fracción proteica total

Las neuronas corticales provenientes de los diferentes tratamientos fueron homogenizadas con buffer de homogenización (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Igepal 1%, DTT 5 mM) suplementado con inhibidores de fosfatasa (NaF 10 mM, Na_3VO_4 1 mM) e inhibidores de proteasas (leupeptina 1 μM , aprotinina 1 μM , pepstatina A 1 μM , PMSF 1 mM). Las muestras fueron centrifugadas a 20000 xg por 20 min a 4°C, y el sobrenadante (fracción total) alicuotado y guardado a -20°C hasta su utilización. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry (Lowry y col, 1951), usando seroalbúmina bovina como estándar.

3.4.3.2. Electroforesis y electrotransferencia

Las muestras fueron desnaturalizadas en buffer de muestra (Tris-HCL 62,5 mM pH 6.8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 10%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,002%) a 100°C durante 10 minutos y separadas en geles de poliacrilamida-SDS, gel concentrador al 5% y gel separador al 15%. Se corrió los geles durante aproximadamente 2 horas 30 minutos. Las proteínas fueron electroforéticamente transferidas desde el gel a la membrana de PVDF a 100 V durante 90 min.

Las membranas de PVDF fueron tratadas según el siguiente procedimiento:

- 1) Dos lavados con PBS.

- 2) Bloqueo con leche descremada 4% en PBS 1X-Tween 20 0,1% (PBS-T) y glicina 1%, en agitación durante 1 hora.
- 3) Incubación con el anticuerpo primario diluido en PBS con BSA 1% p/v (**tabla 1**) en agitación durante toda la noche a 4°C.
- 4) Tres lavados de 10 minutos con PBS-T.
- 5) Incubación con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rabanita (**tabla 2**) diluido en PBS con BSA 1% durante 4 horas a temperatura ambiente en agitación.
- 6) Tres lavados de 10 minutos con PBS-T.
- 7) Detección de los complejos antígeno-anticuerpo-peroxidasa mediante un kit comercial de quimioluminiscencia (*Enhanced Chemiluminiscense Plus*, Pierce).
- 8) Exposición de las membranas de PVDF a las placas autoradiográficas (Agfa).
- 9) Revelado de las placas autoradiográficas.
- 10) Escaneo y cuantificación densitométrica utilizando el programa Gel Pro Analyzer.

Para corroborar la carga proteica, las membranas fueron estripeadas e incubadas p con el anticuerpo anti-actina (1:1000) y se procedió según lo indicado anteriormente.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para WB.

epitope	tipo	dilución	laboratorio
actina	conejo, policlonal	1:1000	Sigma
caspasa-9 activa	conejo, policlonal	1:200	Chemicon
caspasa-3 activa	conejo, policlonal	1:200	Chemicon
sinaptofisina	ratón, monoclonal	1:500	Sigma
PSD-95	conejo, policlonal	1:1000	Sigma

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados para WB.

Epitope	conjugado	tipo	dilución	laboratorio
Conejo IgG	peroxidasa de rabanita	cabra	1:1000	Millipore
Ratón IgG	peroxidasa de rabanita	cabra	1:1000	Millipore

3.5. ESTUDIOS MORFOLOGICOS

3.5.1. Inmunofluorescencia

La proteína MAP-2 es una proteína asociada a microtúbulos, que se expresa en el soma neuronal y en las dendritas. Realizamos inmunofluorescencia para dicha proteína y estudiamos parámetros morfométricos como: el largo del árbol dendrítico, la longitud de las dendritas primarias, la longitud de las dendritas secundarias y el número de dendritas primarias y secundarias por célula.

Luego del tratamiento, las células fueron fijadas con PAF 4% en PBS y se procedió según el siguiente protocolo:

- 1) Dos lavados con PBS.
- 2) Incubación con una solución de permeabilización compuesta por Tritón X-100 0,1% en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Tres lavados con PBS.
- 4) Incubación con una solución de bloqueo compuesta por suero normal ovino (SNO) 5% v/v en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Descarte de la solución de bloqueo.
- 6) Incubación con el anticuerpo primario anti MAP-2 de ratón 1:1000 en SNO 1% v/v pH 7,4 en PBS, durante toda la noche a 4°C.
- 6) Tres lavados con PBS.
- 7) Incubación con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a fluoresceína (1:1000 en SNO 1% v/v pH 7,4 en PBS), durante 4 horas a temperatura ambiente, cámara húmeda y oscuridad.
- 8) Tres lavados con PBS.
- 9) Montaje de los cultivos con Fluoroshield y cubreobjetos para la observación con microscopio de fluorescencia. La obtención de imágenes digitales se llevaron a cabo en condiciones estandarizadas (en la misma sesión de medición, en el mismo día).

En cada preparado, se seleccionó al azar el campo microscópico a estudiar y se cuantificó:

• **largo total del árbol dendrítico**, fue determinado como la suma del largo de las dendritas de cada célula individualmente. Con una magnificación de 10X, se contaron por lo menos 100 células por muestra seleccionadas al azar.

- **longitud de las dendritas primarias y secundarias**, denominándose dendritas primarias a las que nacen del soma y secundarias a las que nacen de las primarias.

- **número de dendritas primarias y secundarias** por célula.

3.6. ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES

Los estudios ultraestructurales se realizaron por microscopía electrónica de transmisión (MET). Para ello, los cultivos primarios de neuronas corticales fueron tratados en ausencia (grupo control) y presencia de EtOH 50 mM en el DIV 7 durante 24 hs. Al finalizar el tratamiento se lavaron los cultivos con una solución amortiguadora de fosfato 0,1M pH 7,4. Las células fueron fijadas en la placa con glutaraldehído 1,5% más formaldehído 1% en buffer cacodilato 0,1 M, pH 7,4, a 4°C por 60 min. Luego se los postfijaron durante 60 minutos con tetróxido de osmio 2% v/v en la misma solución amortiguadora de fosfatos. Las neuronas fueron luego tratadas con ácido tánico 0,1% en el mismo buffer por 1 min a temperatura ambiente. Se realizó un lavado con el mismo buffer; se contrastó el tejido con acetato de uranilo acuoso 2% p/v por 120 min a temperatura ambiente y se deshidrató con alcohol. Finalmente fueron incluidas en monocapa con un kit de resina Epoxy (Fluka AG, Chemische Fabrik, Buchs SG, Switzerland) siguiendo el procedimiento con pequeñas modificaciones descrito por Martín y col. (2010). La monocapa celular fue cubierta por una capa de 2-3 mm de resina epoxy disuelta en etanol 1:1, luego 1:2, hasta hacerlo en resina sola a 60°C por tres días para completar su polimerización. La monocapa celular fue luego removida de las placas de Petri e inmediatamente introducida en cápsulas de resina para poder obtener cortes ultrafinos de 50 nm con un ultramicrotomo *Reichert-Jung Ultracut E*. Esos cortes se tiñeron con acetato de uranilo por 20 min y citrato de plomo por 1 min. Finalmente, los cortes, una vez montados en grillas de cobre de 300 mesh, fueron examinados y fotografiados en un microscopio electrónico Zeiss 109 perteneciente al Laboratorio Nacional de Análisis y Servicios en Microscopía Electrónica (LANAIS-MIE) dependiente del Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Eduardo De Robertis".

A partir de las imágenes obtenidas de los cortes procesados para MET, con una magnificación de 30000X se cuantificó la densidad de los microtúbulos. Se midió el número de microtúbulos en cortes transversales de neuritas ya que a este nivel no

podemos diferenciar dendritas de axones. Se seleccionaron al azar los cortes transversales de las neuritas del control y de los cultivos expuestos a EtOH 50 mM por 24 hs y se analizaron con el programa ImageJ.

Cuantificación de la densidad numérica de los microtubulos, fue determinado como el número de microtúbulos por μm^2 .

3.7. ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (ESM). Cada experimento se realizó por lo menos tres veces de forma independiente.

Los análisis estadísticos se explicitan en los epígrafes de cada figura. Brevemente, para comparar tres o más grupos se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) de una vía o de dos vías cuando dos factores estaban presentes. Las pruebas de Dunnett's se realizaron para detectar significancias entre los grupos. En el caso de comparación entre dos grupos se realizó la prueba de t de Student. Los supuestos de normalidad y homocedacia fueron comprobados.

Las diferencias se consideraron significativas con $P < 0,05$. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa *GraphPad Prism v5.00* (GraphPad Software Inc.).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de los cultivos primarios neuronales

Los cultivos primarios de neuronas permiten manipular el medio ambiente en el que vive la célula y estudiar la respuesta de la misma de manera prácticamente inmediata. Los cultivos neuronales de baja y mediana densidad son relativamente simples, ya que no poseen la complejidad de los tejidos de los cuales provienen, convirtiéndolos en la preparación ideal para investigar aspectos importantes de la biología neuronal. Las líneas celulares clonales se han usado como modelos para el estudio de la fisiología neuronal, sin embargo, éstas células deben ser estimuladas con factores neurotróficos y cultivadas en condiciones adecuadas para simular el comportamiento fisiológico de células nerviosas como la generación de procesos (dendritas y axones) y la formación de conexiones neuronales (Longart y col., 2009), lo que presenta limitaciones al establecer una comparación directa entre el comportamiento de las células nerviosas *in vivo* y estos modelos. Por otra parte, aspectos de la biología neuronal como son la diferenciación, tráfico y localización subcelular de proteínas, así como ensayos con drogas de potencial terapéutico son estudiados mayormente en cultivos primarios de células del sistema nervioso, razones que justifican el amplio uso de estos cultivos (Zhang y col., 2008; Molina-Holgado y col., 2008).

Las investigaciones sobre el desarrollo de células individuales del tejido nervioso requieren del estudio de la distribución diferencial de marcadores específicos. Las condiciones de cultivo *in vitro* permiten el crecimiento de células a baja o mediana densidad, que facilitan la observación de neuronas individuales (Kaeck y Banker, 2006; Misonou y Trimmer, 2005). El estudio de estas células en cultivos homogéneos y de densidad controlada, hace posible monitorear los cambios experimentados durante el período de cultivo.

La interpretación del funcionamiento del sistema nervioso tanto en condiciones normales como patológicas es un tema muy controvertido y de gran interés científico. Sin embargo, la gran diversidad y complejidad de las estructuras y los procesos involucrados en su funcionamiento hacen difícil la comprensión de su fisiología. No obstante, gracias a la implementación de los cultivos celulares se ha facilitado enormemente el estudio de las estructuras, ofreciendo una mayor comprensión de este

complejo sistema (Shaikh y Nicholson, 2008; Brewer, 1995; Czesak y col., 2007; Narayan y col., 2007; Jun y col., 2007; Correa y Longart, 2010).

Para establecer modelos de crecimiento y funcionamiento celular *in vitro* que tengan relevancia fisiológica deben incorporarse al sistema de cultivo los componentes del ambiente *in vivo*; estos comprenden principalmente el sustrato así como componentes generales de los medios de cultivo (vitaminas, factores de crecimiento, etc.) (Lochter y col., 1995). El medio de cultivo Neurobasal™, libre de suero y suplementado con B27, fue uno de los factores determinante para la selectividad del cultivo, tanto en nuestro sistema como en el de otros (Kaeck y Banker, 2006). Los medios libres de suero son especialmente útiles para el control de concentraciones críticas de factores de crecimiento, hormonas y algunos aminoácidos, necesarios para la selección celular del cultivo (Brewer y col., 1993), dado que la presencia de suero ocasionaría que las neuronas crezcan a concentraciones mayores a 300 células/mm² lo que no permitiría una observación de células individuales, además de una amplia proliferación de células gliales. El Medio Neurobasal™ es un medio comercial especial para cultivo neuronal, por otra parte, el B27 presenta condiciones que favorecen el desarrollo de células neuronales por encima del desarrollo glial, tales como concentraciones óptimas de algunos aminoácidos, sulfato de zinc, vitamina B12, entre otros, en comparación con otros medios de cultivo como DMEM y DMEM/F12 (Brewer y col., 1993).

A partir del extracto celular de las cortezas de los embriones se logró obtener un cultivo celular homogéneo, de baja a mediana densidad, en donde se pudo observar células de manera independiente. Dichos cultivos se caracterizaron por inmunocitoquímica. Se realizó una inmunofluorescencia doble marcado utilizando un marcador neuronal (MAP-2) y un marcador de astrocitos (GFAP) y demostramos que los cultivos están enriquecidos en neuronas. En este tipo de cultivos, es de principal interés obtener neuronas de manera homogénea y mayoritaria, para la preservación de las principales características funcionales.

Como se puede observar en las micrografías obtenidas (**Fig. 10**), las células en cultivo muestran un crecimiento progresivo de las neuritas, así como también un aumento en la complejidad de la red neuronal. Sin embargo, en todos los períodos estudiados se pudo observar células individuales, lo que garantizó la precisión de las observaciones con el marcaje inmunofluorescente. Las neuronas se mantuvieron en buen estado hasta 18 días en cultivo, posterior a este tiempo se comenzó a observar un

deterioro del cuerpo celular y la fragmentación de los procesos, razón por la cual no se emplearon cultivos posteriores a este periodo.

Las condiciones utilizada en los cultivos primarios de neuronas corticales, permitió analizar a nivel de la microscopía óptica, la forma, la distribución de los distintos tipos de procesos (dendritas primarias, secundarias), así como la sobrevivencia neuronal en las distintas condiciones de cultivo.

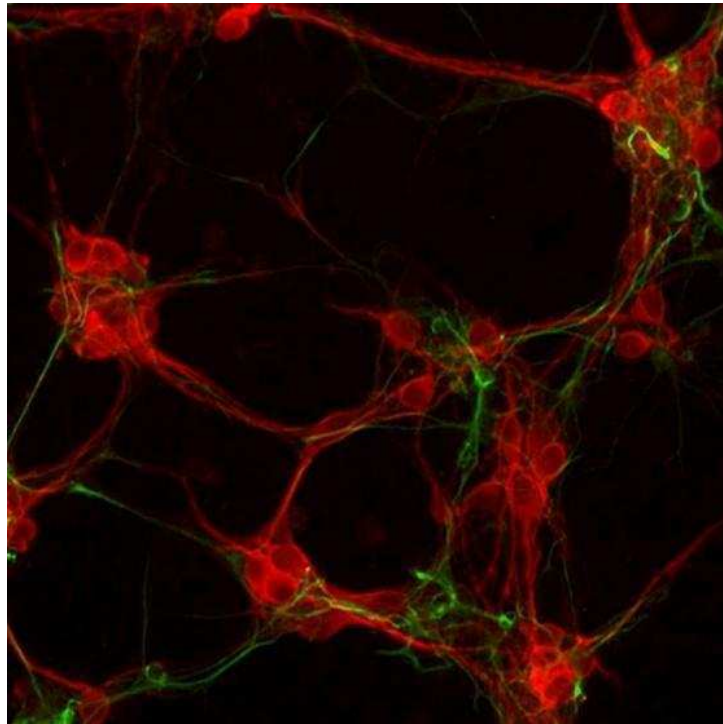
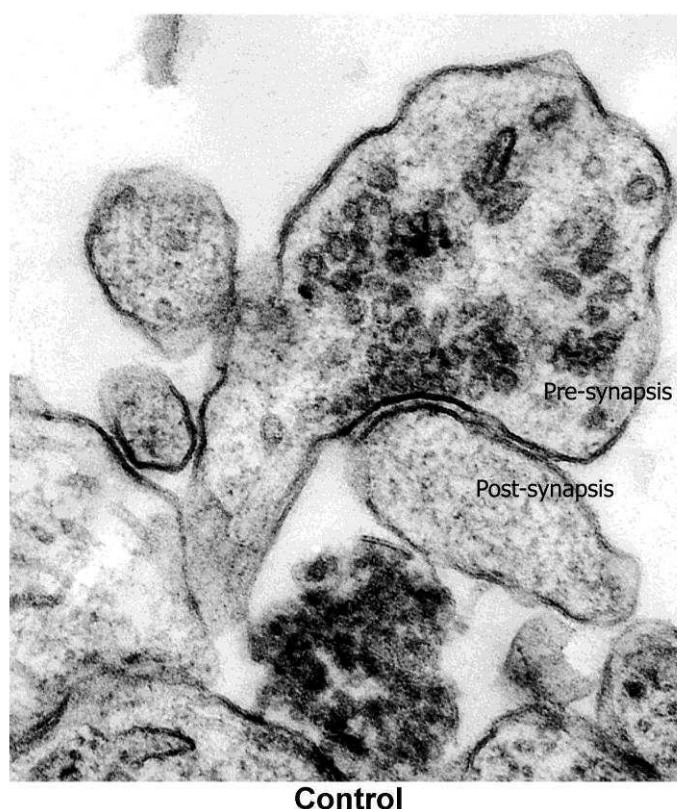


Figura 10. Inmunofluorescencia de los cultivos neuronales. Imágenes de los cultivos obtenidas por microscopía de epifluorescencia inmunomarcadas con anticuerpo anti-MAP-2 (color rojo) y anti-GFAP (color verde).

Estudiamos también la ultraestructura de los cultivos y observamos la presencia de contactos sinápticos en los que se observan el terminal presináptico con acumulación de vesículas, el espacio sináptico y la postsinapsis (**Fig. 11**). El mecanismo mediante el cual se forman y se mantienen las sinapsis durante el desarrollo de las redes neuronales es de suma importancia en el estudio del funcionamiento de las células del sistema nervioso (Fletcher y col., 1991).



Control

Figura 11. Estudio de la ultraestructura de la sinapsis en cultivos primarios neuronales. Fotomicrografías electrónicas de transmisión de neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*, incubadas en ausencia (control) de EtOH, en la que se observa un contacto sináptico.

4.2. Efecto del EtOH sobre la viabilidad celular en cultivos primarios de neuronas corticales

Dado que uno de los objetivos del presente trabajo fue estudiar el efecto de diferentes concentraciones de EtOH sobre la viabilidad celular en cultivos primarios neuronales, se llevó a cabo un ensayo que se basa en la reducción metabólica del MTT a un compuesto coloreado de color azul, el formazán, por la actividad enzimática de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (Ribbley col., 2005). Este método se utiliza para medir supervivencia y proliferación celular, ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Se determinó el número de células viables después de la exposición a EtOH en los cultivos primarios neuronales de corteza de rata. Como se observa en la **figura 12**, la exposición a EtOH 50 y 100 mM durante 24 hs produjo una disminución significativa

en la viabilidad celular en las neuronas corticales de 7 días respecto al control (C: 100% vs EtOH 50mM: $73 \pm 3\%$; C vs EtOH 100mM: $65 \pm 8\%$). Se relativizó el porcentaje de células vivas al control que es el 100% (**Fig. 12**).

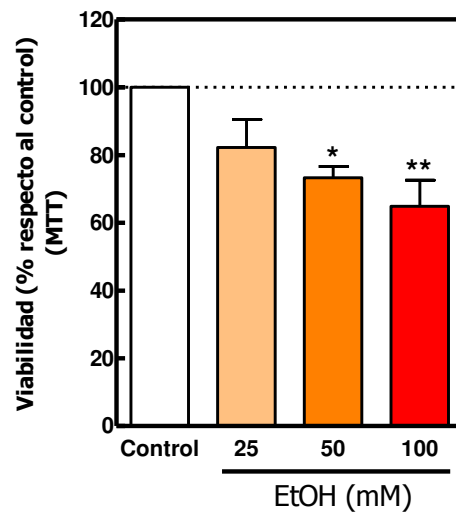


Figura 12. La exposición a EtOH produce una reducción en la viabilidad de las neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*. La viabilidad celular fue determinada en cultivos de neuronas corticales en ausencia (Control) y presencia de etanol (EtOH) durante las últimas 24 hs como se describió previamente en materiales y métodos. Las barras representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Otro de nuestros objetivos fue investigar si el efecto del EtOH varía según el estadio de diferenciación neuronal. Para ello se evaluó el efecto del EtOH en cultivos neuronales de 14 días. Tal como se observa en la **figura 13**, la exposición de los cultivos neuronales de 14 días a concentraciones crecientes de EtOH durante 24 hs produjo una disminución significativa en la viabilidad celular respecto al control (C: 100% vs EtOH 25mM: $89\pm 2\%$; C vs EtOH 50mM: $63\pm 2\%$; C vs EtOH 100mM: $68\pm 2\%$). Incluso la concentración más baja utilizada de EtOH (25 mM), que en los cultivos de 7 días no había alterado significativamente su viabilidad, en los cultivos neuronales de 14 días sí la afecta.

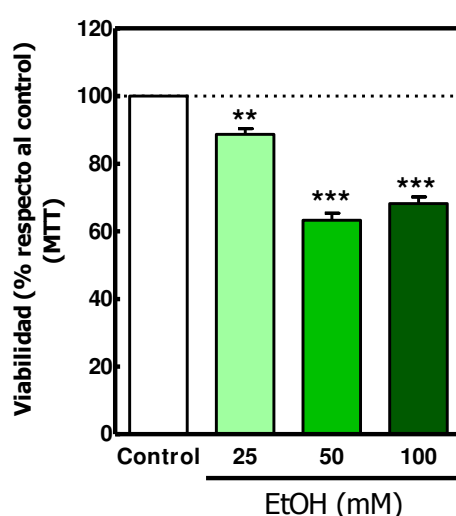


Figura 13. La exposición a EtOH produce una reducción en la viabilidad de las neuronas corticales de 14 días de crecimiento *in vitro*. La viabilidad celular fue determinada en cultivos de neuronas corticales en ausencia (control) y presencia de etanol (EtOH) por 24 hs como se describió previamente en materiales y métodos. Las barras representan la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Para estudiar si había diferencia con respecto a los días en que los cultivos eran tratados con EtOH hicimos un ANOVA de dos vías analizando todos los datos y observamos que no había cambios en la viabilidad entre las neuronas tratadas con EtOH a los 7 o a los 14 días (**Fig. 14**).

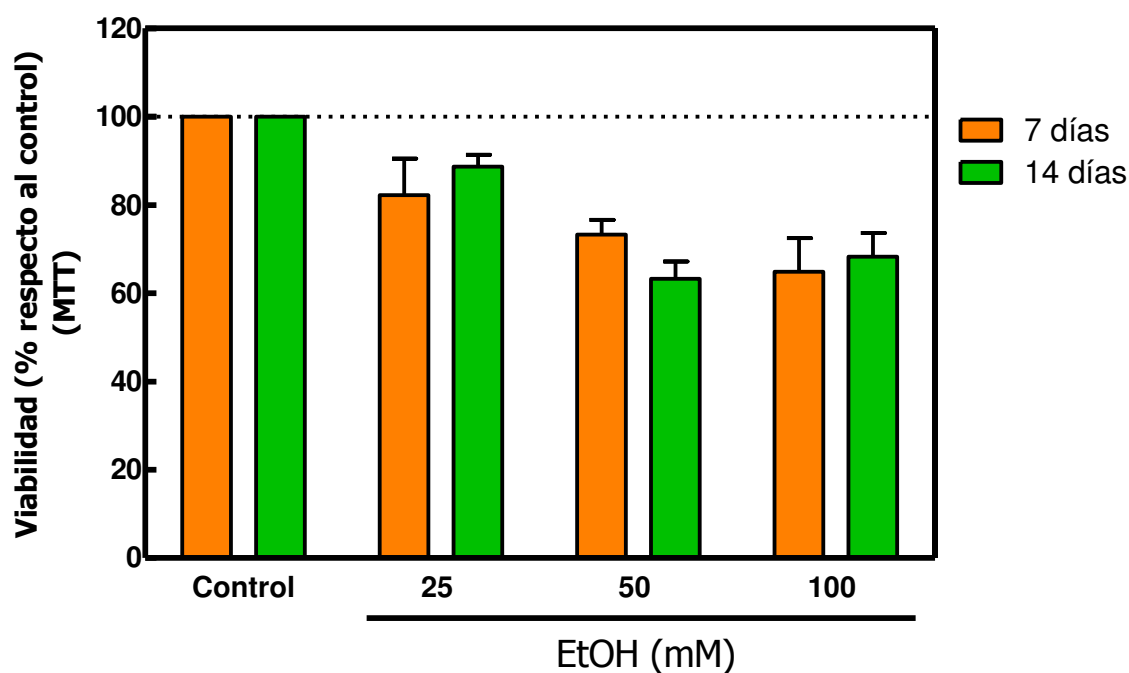


Figura 14. La viabilidad de las neuronas tratadas con EtOH a los 7 días no difiere de las tratadas con EtOH a los 14 días. La viabilidad celular fue determinada en cultivos de neuronas corticales en ausencia (control) y presencia de etanol (EtOH) por 24 hs como se describió previamente en materiales y métodos. Las barras representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni comparando los cultivos de 7 días vs 14 días.

4.3. Estudio del tipo de muerte celular inducida por EtOH mediante la utilización de naranja de acridina/ bromuro de etidio.

Considerando que el ensayo de MTT no distingue entre células que sufren apoptosis o necrosis, se llevó a cabo un estudio a nivel morfológico para determinar el tipo de muerte inducida por el EtOH. La morfología nuclear fue evaluada mediante la utilización simultánea de NA y BrEt.

Este método de identificación de la morfología nuclear por microscopia de fluorescencia fue utilizado por su simplicidad, economía y rapidez. Las tinciones fluorescentes son apropiadas para células en cultivo. En este ensayo, el porcentaje de células apoptóticas y de células con integridad de su membrana se puede estudiar simultáneamente ya que no hay ningún paso de fijación, de esta forma se evitan un número potencial de artefactos (Renvoize y col., 1998). La NA penetra en todas las células, se intercala en el ADN y tiñe a todos los núcleos de color verde. El BrEt es captado solo por células no viables, ya que solo ingresa en aquellas células que perdieron la integridad de su membrana plasmática, tiñendo a los núcleos de color rojo. El BrEt domina sobre la NA. Las células vivas presentan núcleos normales de color verde brillante; las células apoptóticas tempranas presentan núcleos verde brillante con cromatina condensada o fragmentada; las células apoptóticas tardía (necrosis secundaria) muestran una cromatina condensada o fragmentada de color naranja; las células que murieron directamente por necrosis presentan núcleo de color naranja difuso (Renvoize y col., 1998).

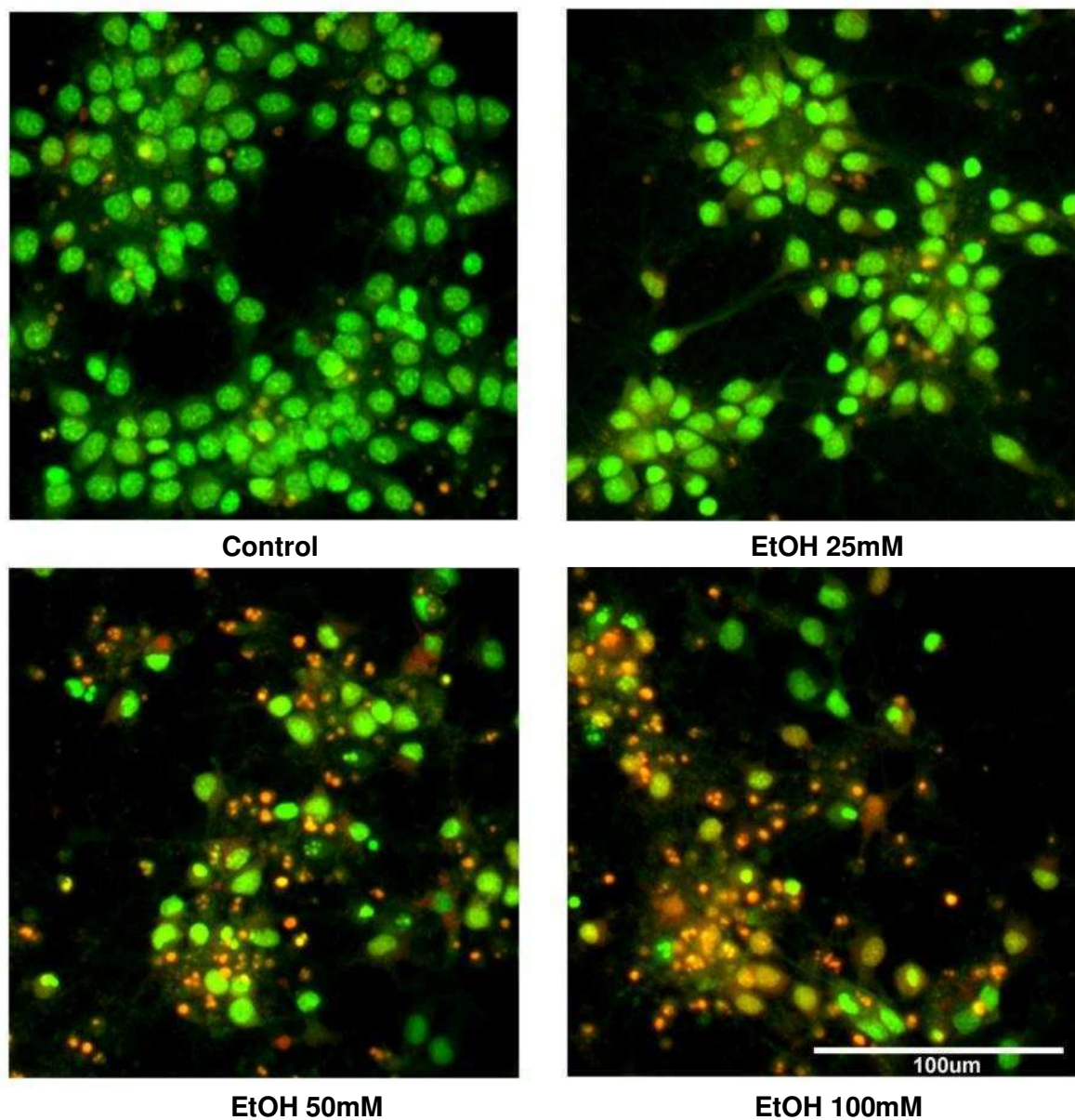


Figura 15. La exposición a EtOH produce un aumento en la apoptosis y necrosis en neuronas corticales primarias de 7 días de crecimiento *in vitro*. Imágenes representativas de neuronas corticales obtenidas por microscopía de epifluorescencia teñidas con NA y BrEt.

Los cultivos de 7 días de crecimiento *in vitro*, luego de 24 hs de exposición a concentraciones crecientes de EtOH, presentaron una disminución significativa en el porcentaje de células con morfología viable con respecto al control (C: $75\pm 2\%$ vs EtOH 50mM: $64\pm 3\%$, C vs EtOH 100mM: $56\pm 4\%$), (**Fig. 16a**).

El EtOH, en concentración 100 mM durante 24 hs, produjo un aumento significativo en el porcentaje de núcleos compatible con células necróticas con respecto al control (C: $2\pm 0,5\%$ vs EtOH 100mM: $7\pm 2\%$) (**Fig. 16b**).

Así mismo se observó que el porcentaje de núcleos apoptóticos aumentó significativamente en los cultivos tratados con EtOH 50 mM y 100 mM con respecto al control (C: $23\pm 2\%$ vs EtOH 50mM: $33\pm 2,5\%$, C vs EtOH 100mM: $37\pm 3,5\%$), (**Fig. 16c**).

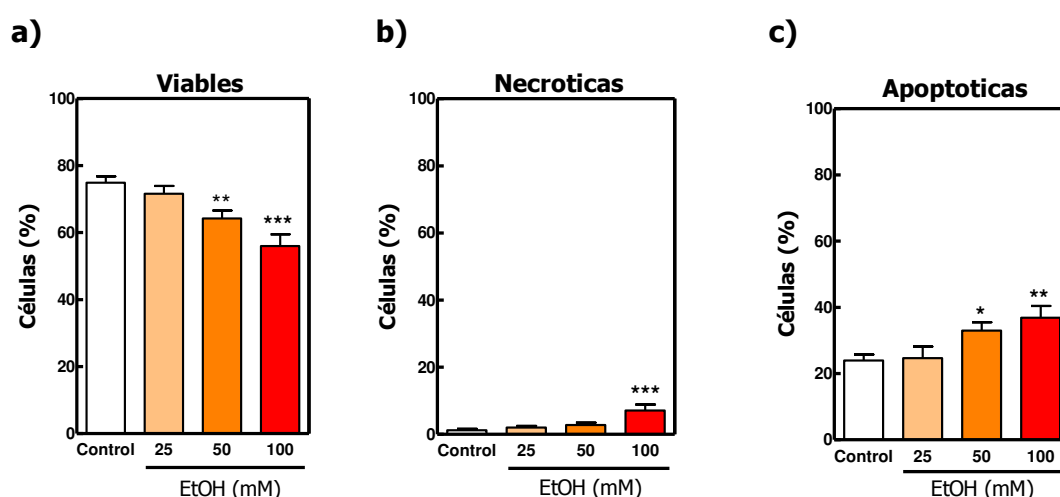


Figura 16. La exposición a EtOH produce un aumento en la apoptosis y necrosis en neuronas corticales primarias de 7 días de crecimiento *in vitro*. Porcentaje de células con morfología nuclear compatible con núcleos viables, necróticos y apoptóticos mediante la utilización simultánea de NA y BrEt. Las barras representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.4. Medida del efecto de la exposición a EtOH sobre la apoptosis celular mediante la técnica de TUNEL.

La técnica de TUNEL permite observar la fragmentación del ADN *in situ*, estudiando a las células en forma individual.

Los datos obtenidos demostraron que las neuronas de 7 días de crecimiento *in vitro* expuestas a EtOH 50 mM y 100 mM presentaron un aumento significativo en el porcentaje de células TUNEL positivas con respecto al control (C: $22 \pm 1\%$ vs EtOH 50mM: $36 \pm 4\%$, C vs EtOH 100mM: $41 \pm 5\%$), (**Fig. 17**), lo cual sugiere que la exposición a dichas concentraciones de EtOH produjo un aumento en el número de células que sufren apoptosis. Estos resultados se corresponden a los obtenidos mediante la tinción conjunta con NA y BrEt. No hay diferencias significativas entre los cultivos controles y los tratados con EtOH 25mM.

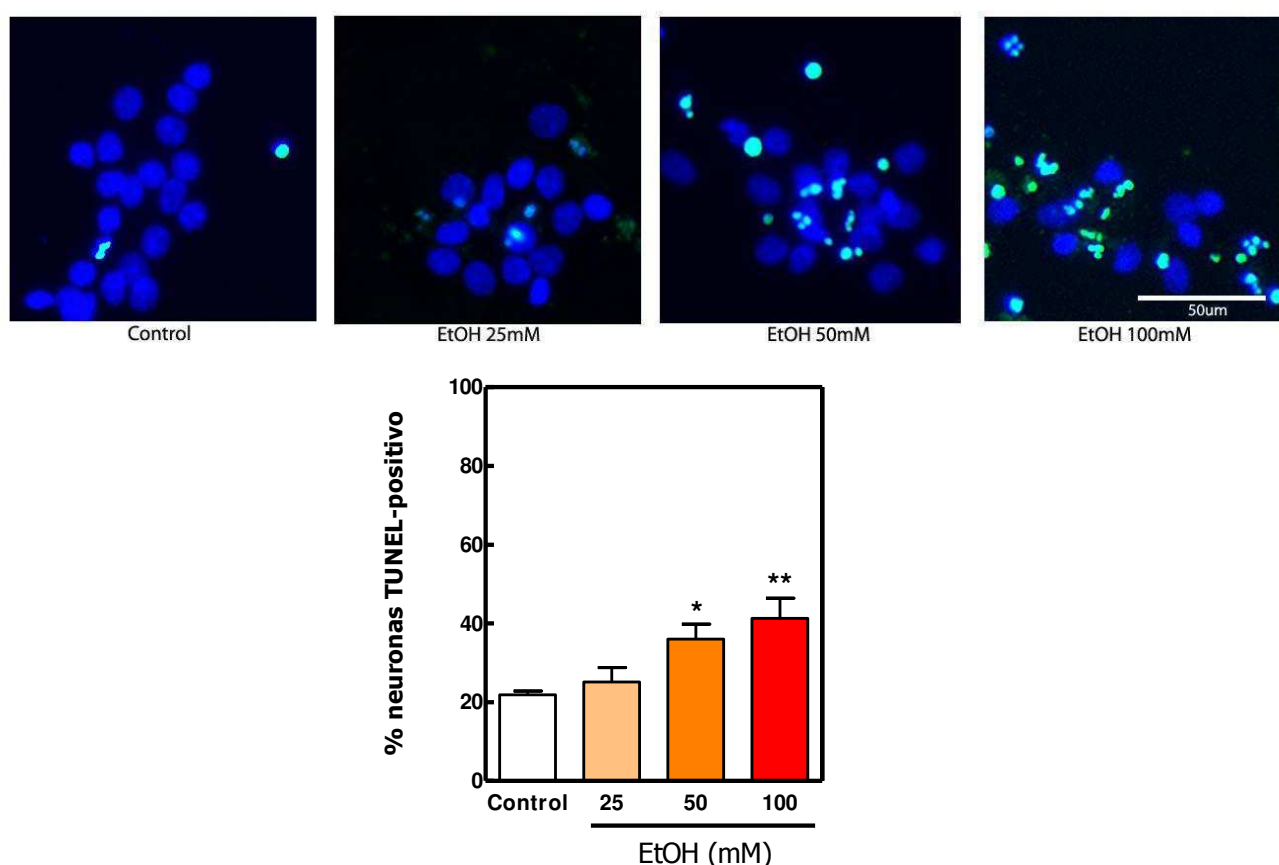


Figura 17. La exposición a etanol aumenta el porcentaje de neuronas TUNEL positivo en cultivos de 7 días de crecimiento *in vitro*. a) Imágenes de neuronas corticales obtenidas por microscopía de epifluorescencia teñidas con Hoechst 33342 (color azul) y TUNEL (color verde). b) Porcentaje de células TUNEL positivas: Las barras representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Cuando estudiamos el porcentaje de neuronas corticales TUNEL positivo en los cultivos de 14 días de crecimiento *in vitro*, observamos que las tres dosis utilizadas de EtOH produjeron un aumento significativo en el porcentaje de células TUNEL positivo con respecto al control (C: $36 \pm 2\%$ vs EtOH 25mM: 51 ± 2 , C vs EtOH 50mM: $58 \pm 2\%$, C vs EtOH 100mM: $65 \pm 3\%$) (**Fig. 18**). De esta forma corroboramos los resultados anteriores ya que obtuvimos el mismo resultado que cuando hicimos el ensayo de MTT en el cual todas las dosis de EtOH utilizadas producían una disminución en la viabilidad celular.

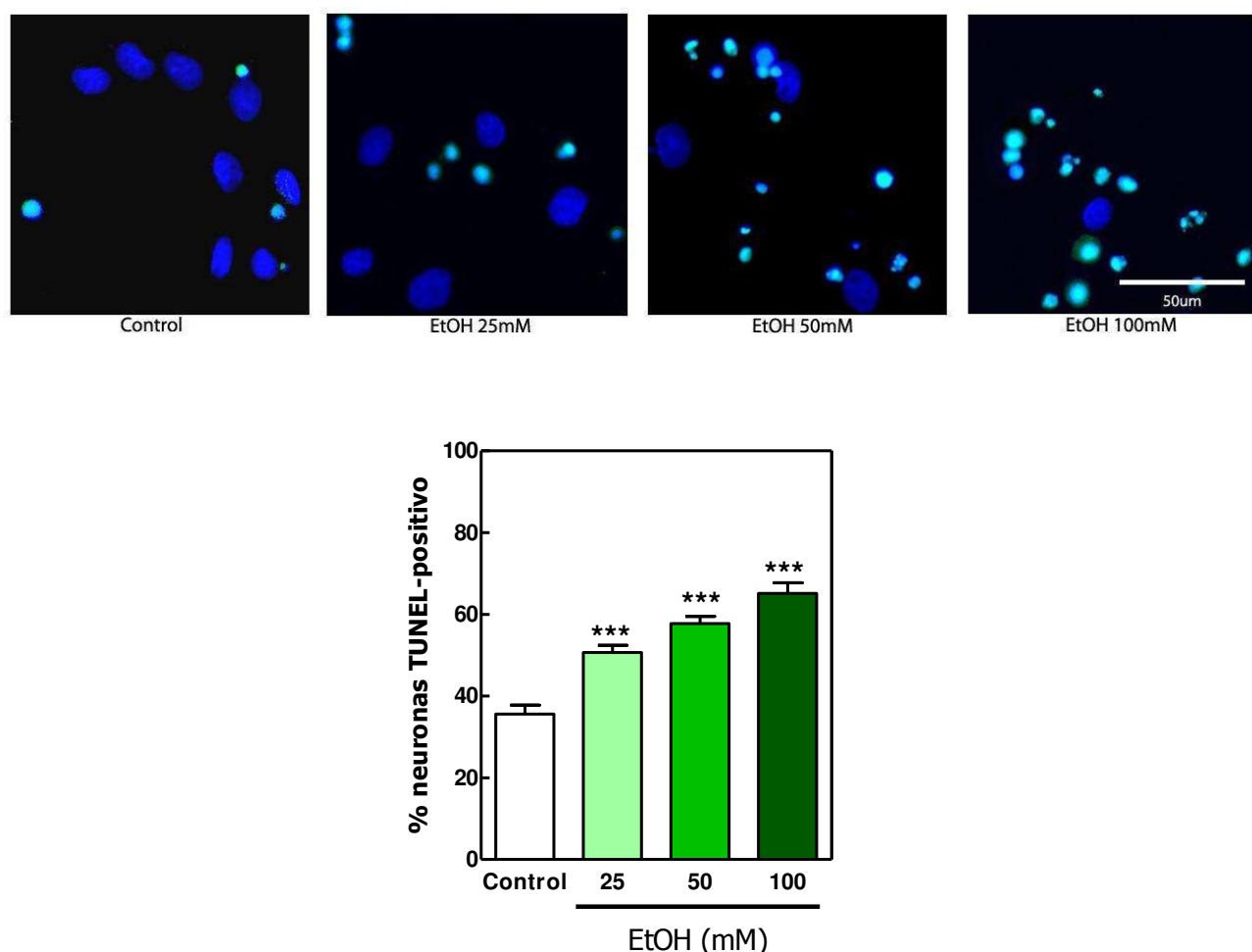


Figura 18. La exposición a EtOH aumenta el porcentaje de neuronas TUNEL positivo en cultivos de 14 días de crecimiento *in vitro*. a) Imágenes de neuronas corticales obtenidas por microscopía de epifluorescencia teñidas con Hoechst 33342 (color azul) y TUNEL (color verde). b) Porcentaje de células TUNEL positivas, mediante la tinción de azul de todos los núcleos con Hoechst y de verde de las células TUNEL positivas. Las barras representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. *** $p < 0,001$.

Para estudiar si había diferencia con respecto a los días en que los cultivos eran tratados con EtOH hicimos un ANOVA de dos vías analizando todos los datos. En este caso, observamos que el porcentaje de neuronas TUNEL positivo de los cultivos de 7 días diferían significativamente de los cultivos de 14 días (**Fig. 19**), sugiriendo una mayor sensibilidad al efecto neurotóxico del EtOH en los cultivos de 14 días de crecimiento, cuanto más maduras las células, más sensibles se vuelven al EtOH. En los cultivos controles de 14 días de crecimiento *in vitro* se observó un porcentaje mayor de neuronas TUNEL positivo con respecto a los cultivos controles de 7 días (Control 14 días: $36 \pm 2\%$ vs Control 7 días: $22 \pm 1\%$) (**Fig. 19**).

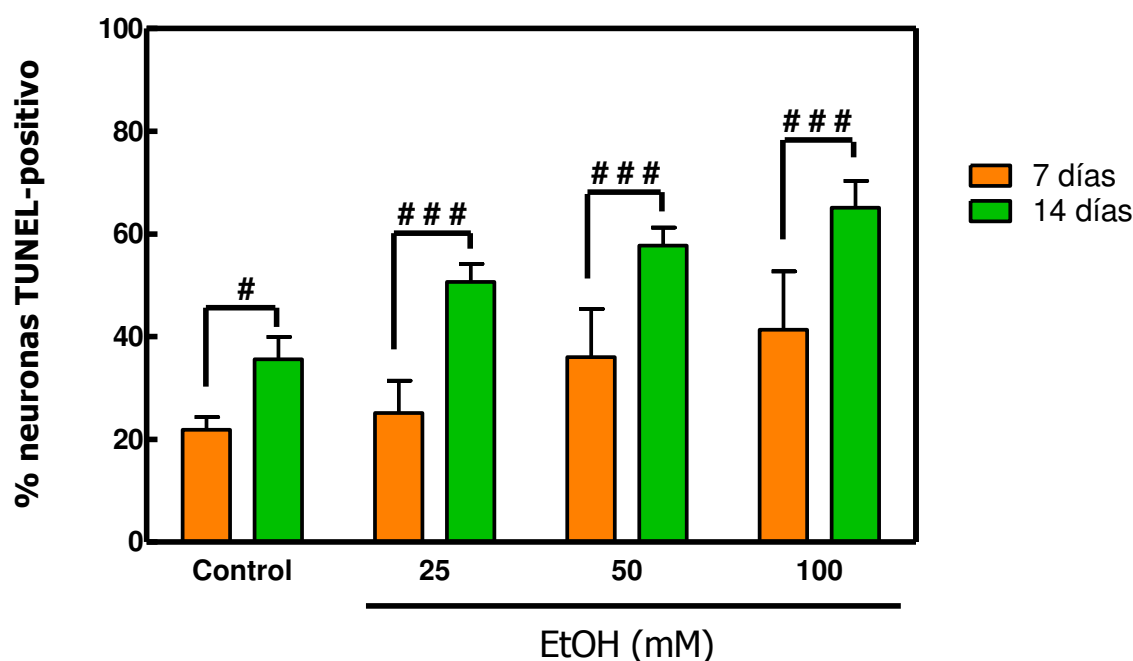


Figura 19. El porcentaje de neuronas TUNEL positivo de las neuronas tratadas con EtOH a los 7 días difiere de las tratadas con EtOH a los 14 días. El porcentaje de células TUNEL positivo fue determinado en cultivos de neuronas corticales en ausencia (control) y presencia de etanol (EtOH) por 24 hs como se describió previamente en materiales y métodos. Las barras representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de dos vías y post test de Bonferroni comparando los cultivos de 7 días vs 14 días.

4.5. Efecto del EtOH sobre el contenido proteico de proteínas apoptóticas

Dado que la exposición a EtOH induce apoptosis en las neuronas, investigamos la participación de proteínas apoptóticas como Caspasa 9 activa (iniciadora) y Caspasa 3 activa (ejecutora) en dicho efecto.

4.5.1. Efecto del EtOH sobre el contenido proteico de Caspasa 9 activa

Estudiamos el contenido proteico de la proteína Caspasa 9 activa en fracciones totales de homogeneizados de neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*, expuestas a EtOH 50 y 100 mM. Como se observa en la **figura 20**, las neuronas corticales expuestas a EtOH 100 mM presentaron un aumento estadísticamente significativo en el contenido proteico de Caspasa 9 activa ($76 \pm 20\%$). No se observaron cambios significativos en los cultivos tratados con EtOH 50 mM. Los valores fueron normalizados a la expresión de actina y relativizados a los niveles del control.

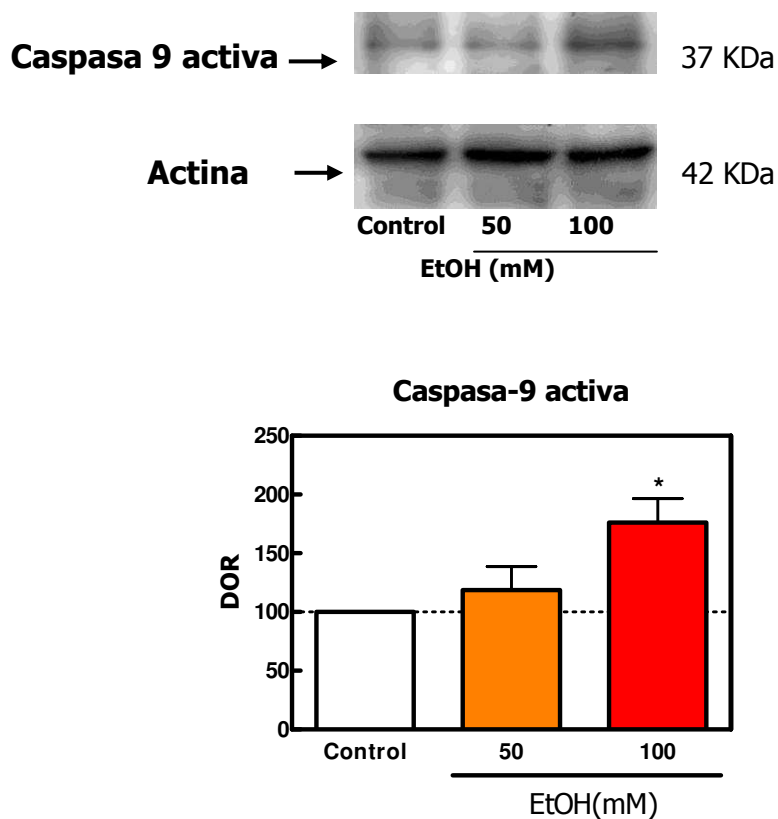


Figura 20. La exposición a EtOH 100 mM aumenta caspasa 9 activa en cultivos de 7 días de crecimiento *in vitro*. Contenido proteico de caspasa-9 activa en cultivos neuronales corticales incubados en ausencia (Control) y presencia de EtOH 50 y 100 mM durante 24 hs. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría óptica y se expresó como porcentaje del valor medido en condiciones basales (Control), al cual se le asignó un valor de 100%. Los datos representados por cada barra representan la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. * $p < 0,05$.

Cuando se investigó el efecto de EtOH sobre el contenido proteico de Caspasa 9 activa en neuronas corticales de 14 días de crecimiento *in vitro* se observó un aumento significativo en casapasa 9 con ambas concentraciones de EtOH ensayadas ($50 \pm 6\%$ para EtOH 50 mM y $88 \pm 17\%$ %, para EtOH 100 mM)(**Fig. 21**). Los valores fueron normalizados a la expresión de actina y relativizados a los niveles del control.

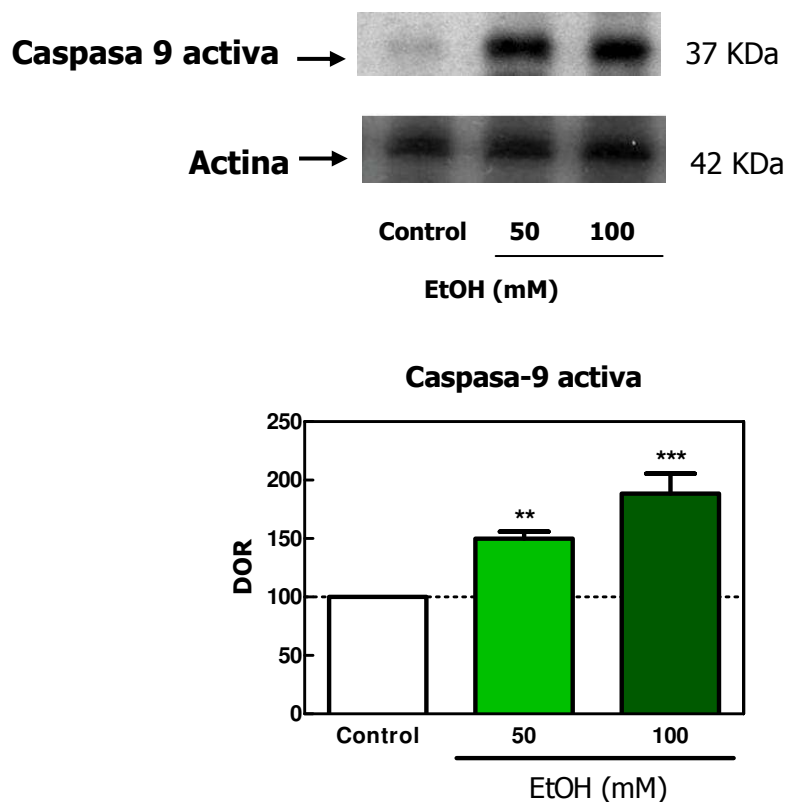


Figura 21. La exposición a EtOH aumenta el contenido proteico de caspasa 9 activa en cultivos de 14 días de crecimiento *in vitro*. Contenido proteico de caspasa-9 activa en cultivos neuronales corticales incubados en ausencia (Control) y presencia de EtOH 50 y 100 mM durante 24 hs. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría óptica y se expresó como porcentaje del valor medido en condiciones basales (Control), al cual se le asignó un valor de 100%. Los datos representados por cada barra representan la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.5.2. Efecto del EtOH sobre el contenido proteico de Caspasa 3 activa

Estudiamos el contenido proteico de Caspasa 3 activa en fracciones totales de homogeneizados de neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*, expuestas a EtOH 50 y 100 mM. Se observó un aumento estadísticamente significativo ($80 \pm 35\%$) en la densidad óptica de Caspasa 3 activa en las neuronas expuestas a EtOH 100 mM con respecto al control (**Fig. 22**). No se observaron cambios significativos en el contenido proteico de caspasa 3 en los cultivos tratados con EtOH 50 mM.

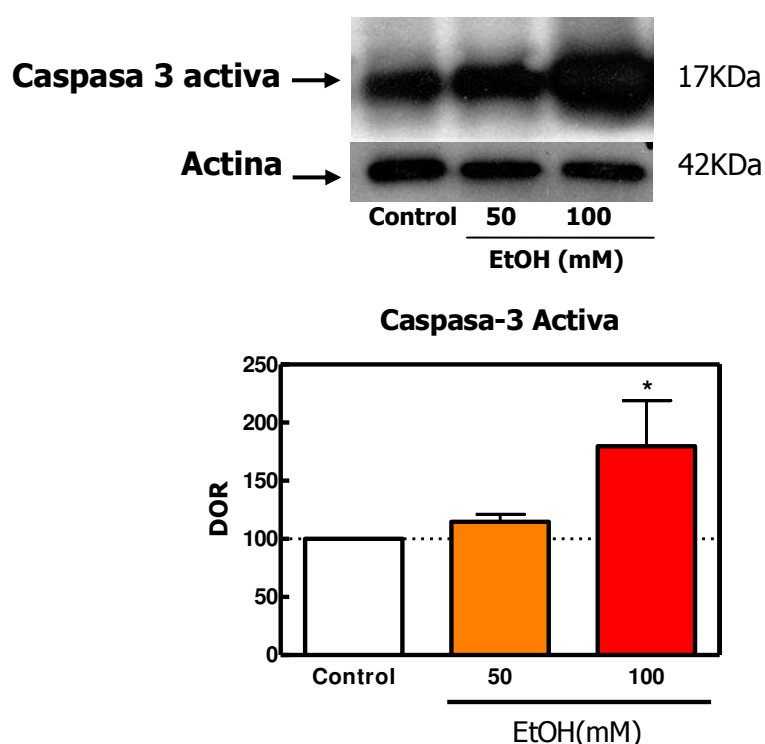


Figura 22. La exposición a EtOH 100mM aumenta el contenido proteico de caspasa 3 activa en cultivos de 7 días de crecimiento *in vitro*. Contenido proteico de caspasa-3 activa en cultivos neuronales corticales incubados en ausencia (Control) y presencia de EtOH 50 y 100 mM durante 24 hs. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría óptica y se expresó como porcentaje del valor medido en condiciones basales (Control), al cual se le asignó un valor de 100%. Los datos representados por cada barra representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. * $p < 0,05$.

Cuando se determinó el contenido proteico de Caspasa 3 activa en fracciones totales de homogeneizados de neuronas corticales de 14 días de crecimiento *in vitro* expuestas a EtOH 50 mM y 100 mM, se observó un aumento estadísticamente significativo en la densidad óptica de Caspasa 3 activa en las neuronas expuestas a EtOH 50 mM (48 ± 14 %) y 100 mM (82 ± 11 %) con respecto al control (**Fig. 23**).

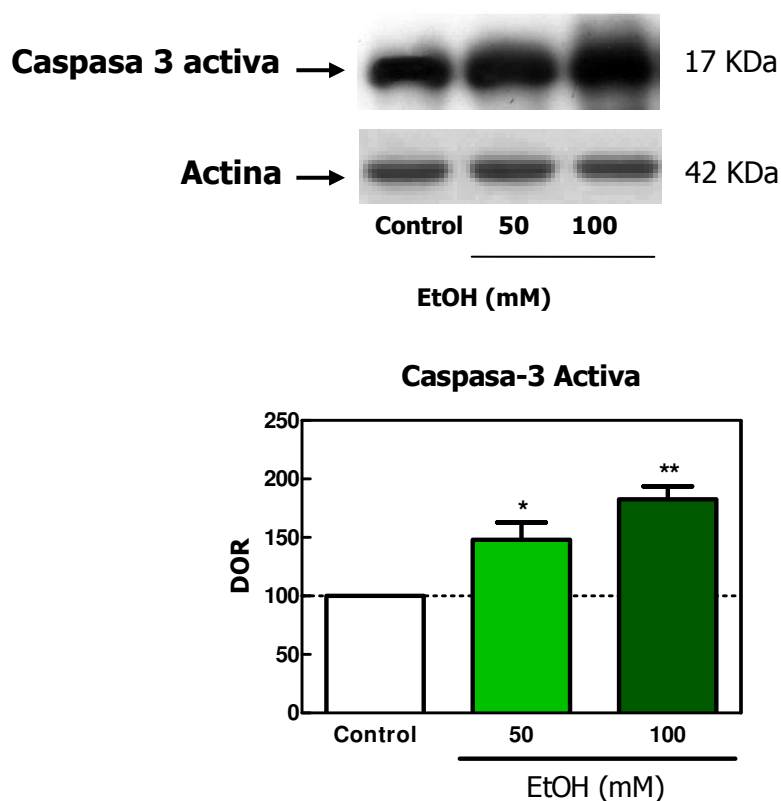


Figura 23. La exposición a EtOH aumenta la expresión de caspasa 3 activa en cultivos de 14 días de crecimiento *in vitro*. Contenido proteico de caspasa-3 activa en cultivos neuronales corticales incubados en ausencia (Control) y presencia de EtOH 50 y 100 mM durante 24 hs. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría óptica y se expresó como porcentaje del valor medido en condiciones basales (Control), al cual se le asignó un valor de 100%. Los datos representados por cada barra representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.6. Efecto de la exposición a EtOH sobre la morfología neuronal

Teniendo en cuenta que determinamos que el EtOH induce apoptosis en los cultivos neuronales corticales, investigamos los cambios en la morfología neuronal inducidos por la exposición a EtOH. Para ello, realizamos inmunofluorescencia para la proteína MAP-2, proteína asociada a microtúbulos que se expresa en el soma neuronal y en las dendritas.

Los parámetros morfométricos evaluados fueron: longitud del árbol dendrítico, longitud de las dendritas primarias, longitud de las dendritas secundarias y el número de dendritas primarias y secundarias por célula.

4.6.1. Análisis morfométricos en cultivos de 7 días de crecimiento *in vitro* expuestos a EtOH

Largo del árbol dendrítico

Se midió la longitud del árbol dendrítico de neuronas seleccionadas aleatoriamente en cultivos primarios de 7 días de crecimiento *in vitro*, expuestas a EtOH 25mM, 50mM y 100mM por 24 hs. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con EtOH 50mM y 100mM provoca una disminución estadísticamente significativa en la longitud del árbol dendrítico con respecto al control (C: $354 \pm 14 \mu\text{m}$ vs 50mM EtOH: $244 \pm 25 \mu\text{m}$, C vs 100mM EtOH: $198 \pm 22 \mu\text{m}$) (**Fig. 24**).

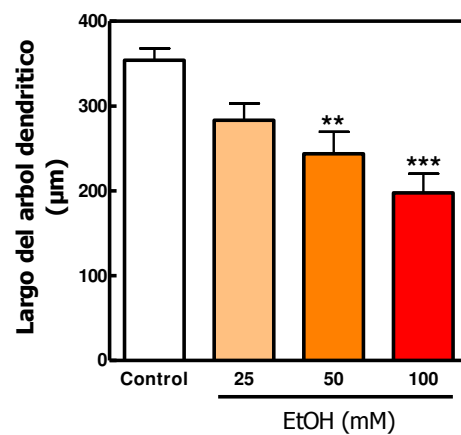
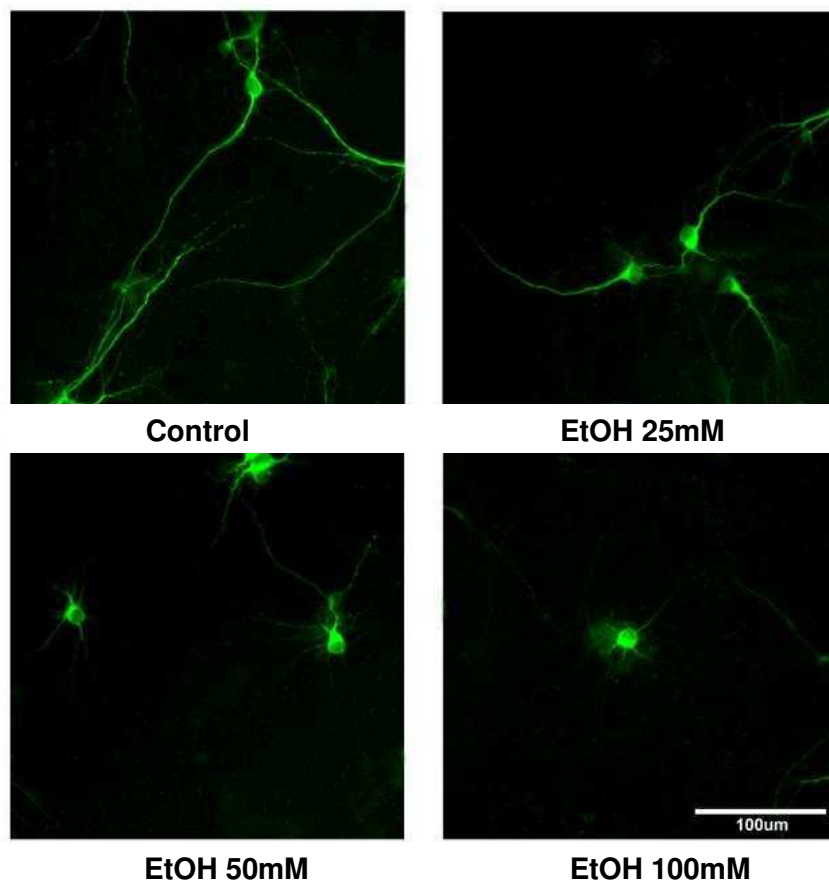


Figura 24. La exposición a EtOH reduce el largo del árbol dendrítico en cultivos de 7 días de crecimiento *in vitro*. Imágenes de neuronas corticales obtenidas por microscopía de epifluorescencia inmunomarcadas con anticuerpo anti MAP-2. Se determinó la longitud del árbol dendrítico de cada célula individualmente seleccionadas al azar. Las barras representan la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Longitud de las dendritas primarias

La longitud del árbol dendrítico depende del largo y número de las dendritas primarias y secundarias por célula. Al analizar cada uno de estos parámetros por separado, observamos que los cultivos primarios neuronales de 7 días de crecimiento *in vitro* incubados con EtOH 50mM y 100mM presentan una disminución significativa en la longitud de las dendritas primarias con respecto al control (C: $80 \pm 4 \mu\text{m}$ vs 50mM EtOH: $51 \pm 3 \mu\text{m}$, C vs EtOH 100mM: $38 \pm 4 \mu\text{m}$) (**Fig. 25a**).

Longitud de las dendritas secundarias

Cuando se evaluó el efecto del EtOH sobre la longitud de las dendritas secundarias, se observó en los cultivos de neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro* que las tres concentraciones crecientes de EtOH produjeron una disminución significativa en la longitud de las dendritas secundarias con respecto al control (C: $38 \pm 4 \mu\text{m}$ vs EtOH 25mM: $28 \pm 3 \mu\text{m}$, C vs EtOH 50mM: $24 \pm 3 \mu\text{m}$, C vs EtOH 100mM: $19 \pm 2 \mu\text{m}$) (**Fig. 24b**).

Número de dendritas primarias por célula

Pese a que el EtOH produjo cambios en la longitud de las dendritas primarias, no se observaron cambios con respecto al control en el número de dendritas primarias por célula en los cultivos primarios neuronales de 7 días de crecimiento *in vitro* tratados con EtOH 25mM, 50mM y 100mM (**Fig. 25c**).

Número de dendritas secundarias por célula

Con respecto al número de dendritas secundarias por célula se observó que solo la concentración más alta de EtOH utilizada afectó negativamente dicho parámetro con respecto al control en los cultivos neuronales de 7 días de crecimiento *in vitro* (C: $2,6 \pm 0,3$ vs 100mM EtOH: $1,4 \pm 0,3$) (**Fig. 25d**).

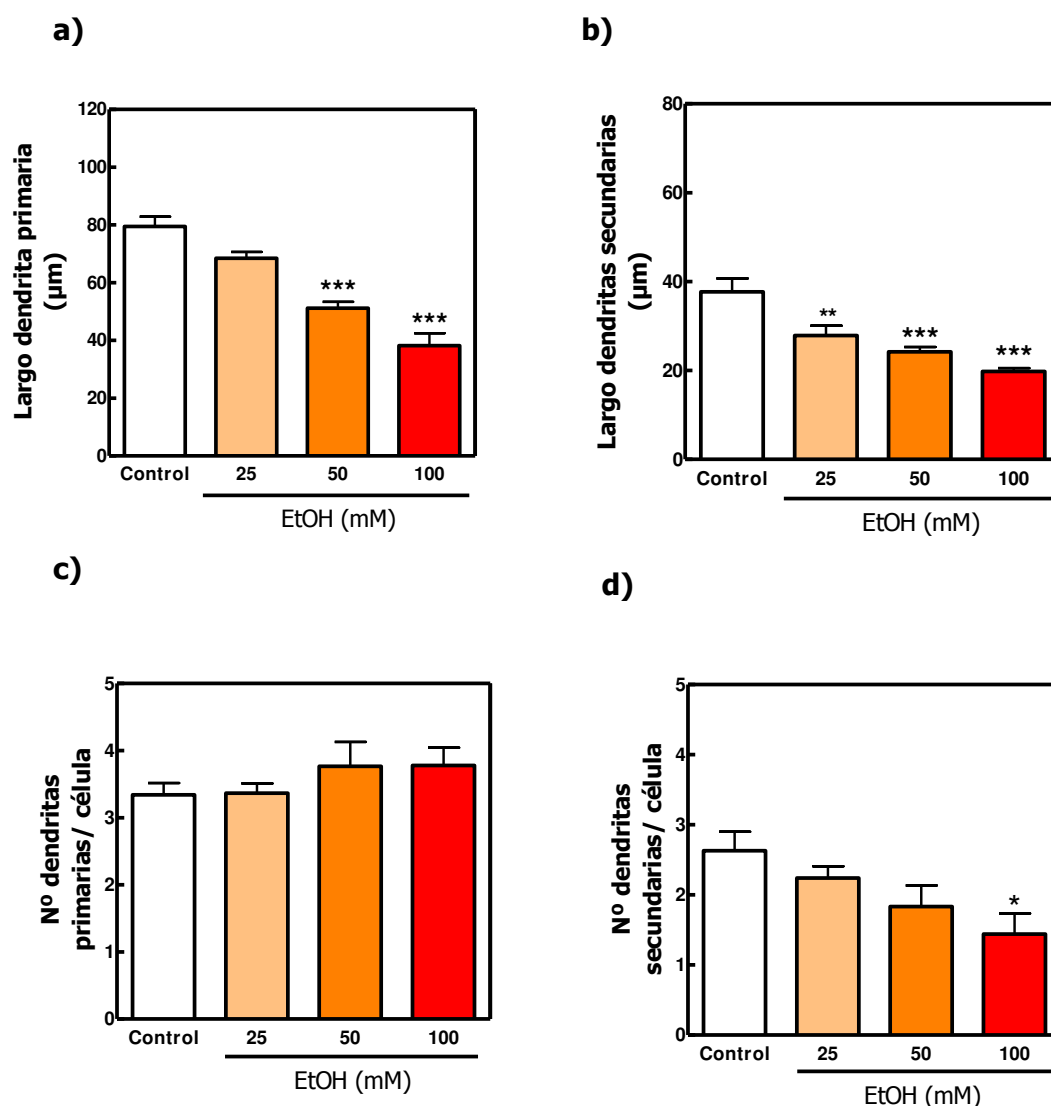


Figura 25. La exposición a EtOH afecta la longitud y el número de dendritas primarias y secundarias en cultivos de neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*. Los cultivos neuronales corticales se incubaron con concentraciones crecientes de EtOH durante 24 hs y se determinó la longitud y número de dendritas primarias y secundarias de cada célula individualmente seleccionadas al azar según se describe en Métodos. Las barras representan la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.6.2. Análisis Morfométricos en cultivos neuronales corticales de 14 días de crecimiento *in vitro*

Longitud del árbol dendrítico

Se determinó la longitud del árbol dendrítico de neuronas seleccionadas aleatoriamente en cultivos primarios de 14 días de crecimiento *in vitro*, expuestas a EtOH 25mM, 50mM y 100mM por 24 hs. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con EtOH 50mM y 100mM provoca una disminución estadísticamente significativa en la longitud del árbol dendrítico con respecto al control (C: $478 \pm 45 \mu\text{m}$ vs 50mM EtOH: $277 \pm 11 \mu\text{m}$, C vs 100mM EtOH: $212 \pm 12 \mu\text{m}$) (**Fig. 26**).

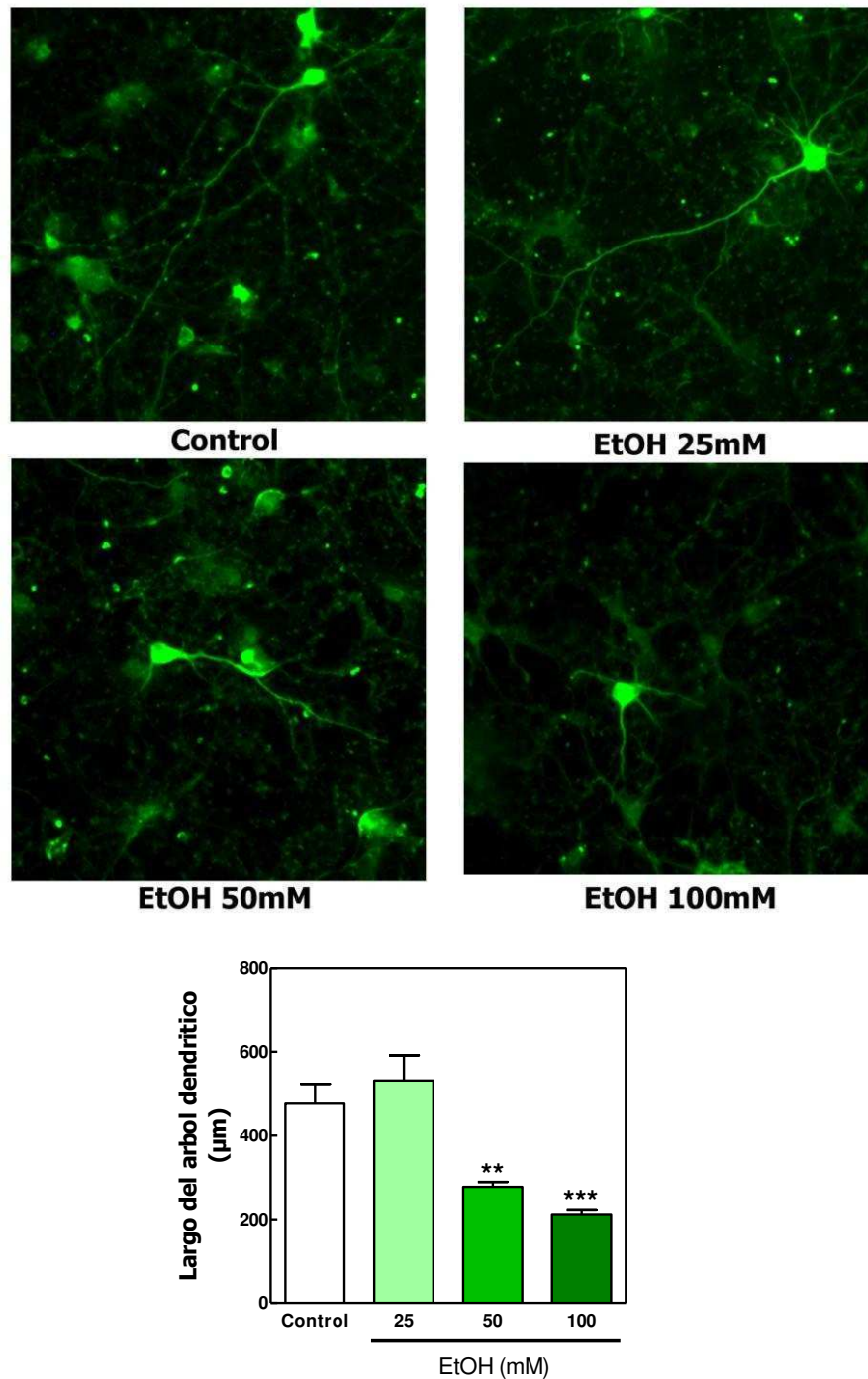


Figura 26. La exposición a EtOH reduce la longitud del árbol dendrítico en cultivos de neuronas corticales de 14 días de crecimiento *in vitro*. Imágenes de neuronas corticales obtenidas por microscopía de epifluorescencia inmunomarcadas con anticuerpo anti MAP-2 previamente incubadas en ausencia (Control) y presencia de diferentes concentraciones de EtOH tal como se describe en Métodos. Se determinó la longitud del árbol dendrítico de cada célula individualmente seleccionadas al azar. Las barras representan la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Longitud de las dendritas primarias

Los cultivos primarios neuronales de 14 días de crecimiento *in vitro* tratados con EtOH 50mM y 100mM presentaron una disminución en la longitud de las dendritas primarias con respecto al control (C: $92 \pm 6 \mu\text{m}$ vs EtOH 50mM: $64 \pm 3 \mu\text{m}$, C vs EtOH 100mM: $50 \pm 2 \mu\text{m}$) (**Fig. 27a**).

Longitud de las dendritas secundarias

En los cultivos de neuronas corticales de 14 días de crecimiento *in vitro* observamos que la concentración de EtOH 50mM y 100mM produjo una disminución significativa en la longitud de las dendritas secundarias con respecto al control (C: $49 \pm 6 \mu\text{m}$ vs EtOH 50mM: $31 \pm 2 \mu\text{m}$, C vs EtOH 100mM: $26 \pm 2 \mu\text{m}$) (**Fig. 27b**).

Número de dendritas primarias por célula

Pese a que el EtOH produjo una disminución en la longitud de las dendritas primarias, no se observaron cambios en el número de dendritas primarias por célula en los cultivos primarios neuronales de 14 días de crecimiento *in vitro* con respecto al control con ninguna de las tres concentraciones de EtOH utilizadas (**Fig. 27c**).

Número de dendritas secundarias por célula

En cuanto al número de dendritas secundarias por célula se observó que el tratamiento de los cultivos neuronales con EtOH 50mM y 100mM produjo una disminución estadísticamente significativa del número de dendritas secundarias con respecto al control (C: $3,3 \pm 0,3$ vs EtOH 50mM: $2,1 \pm 0,2$, C vs EtOH 100mM: $2 \pm 0,3$) (**Fig. 27d**).

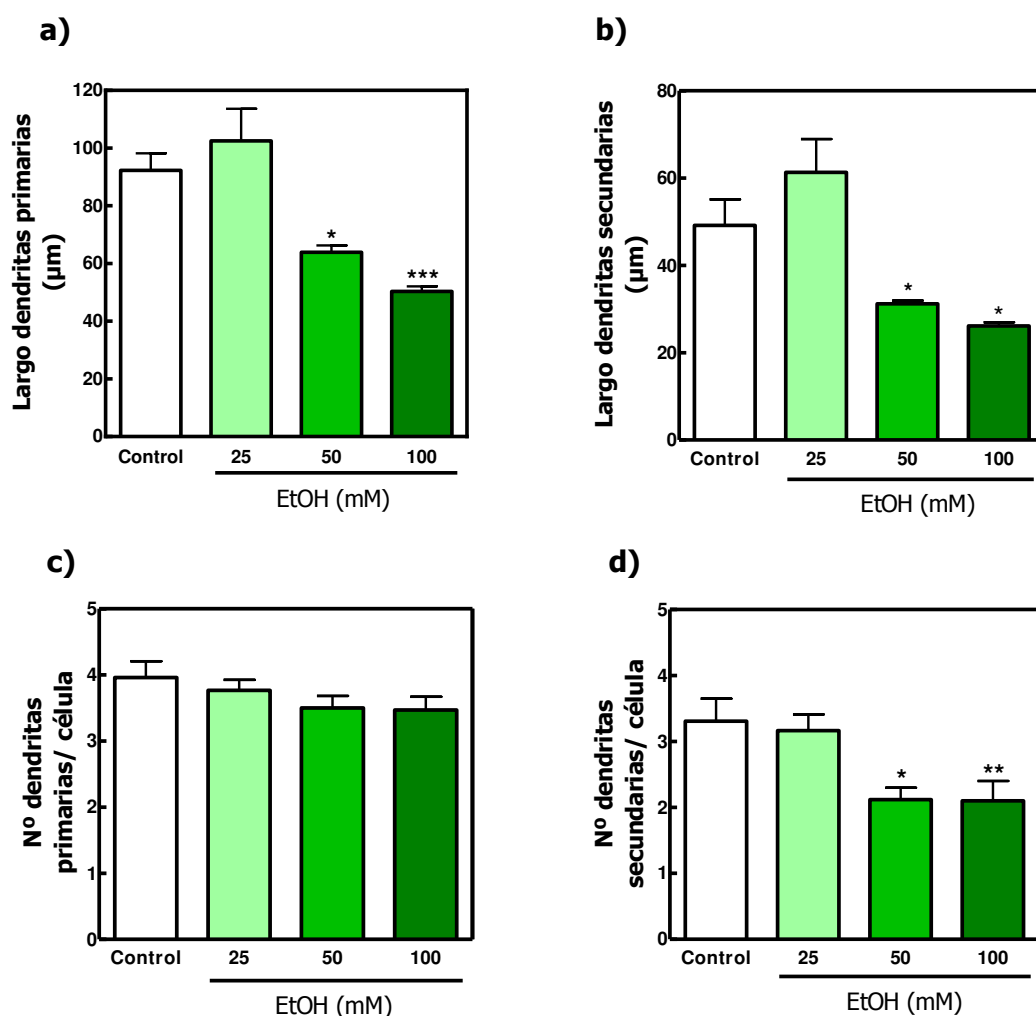


Figura 27. La exposición a EtOH afecta la longitud y el número de dendritas primarias y secundarias en cultivos de neuronas corticales de 14 días de crecimiento *in vitro*. Los cultivos neuronales corticales se incubaron con concentraciones crecientes de EtOH durante 24 hs y se determinó la longitud y número de dendritas primarias y secundarias de cada célula individualmente seleccionadas al azar según se describe en Métodos. Las barras representan la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.7. Patrón de expresión proteica de proteínas sinápticas luego de la exposición a EtOH.

Dado que previamente demostramos que la exposición a EtOH afecta el desarrollo de las dendritas investigamos si el EtOH induce cambios en el contenido proteico de proteínas sinápticas.

4.7.1. Efecto del EtOH sobre el contenido proteico de Sinaptofisina

La sinaptofisina es una glicoproteína de las vesículas sinápticas con cuatro dominios transmembranas de peso molecular 38 kDa.

Cuando investigamos el efecto del EtOH sobre el contenido proteico de sinaptofisina, observamos que las neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*, expuestas a EtOH 100 mM durante 24 h, presentaron una disminución significativa en el contenido proteico de Sinaptofisina ($34 \pm 8\%$) (**Fig. 28**). No se observaron cambios significativos en los cultivos tratados con EtOH 50 mM.

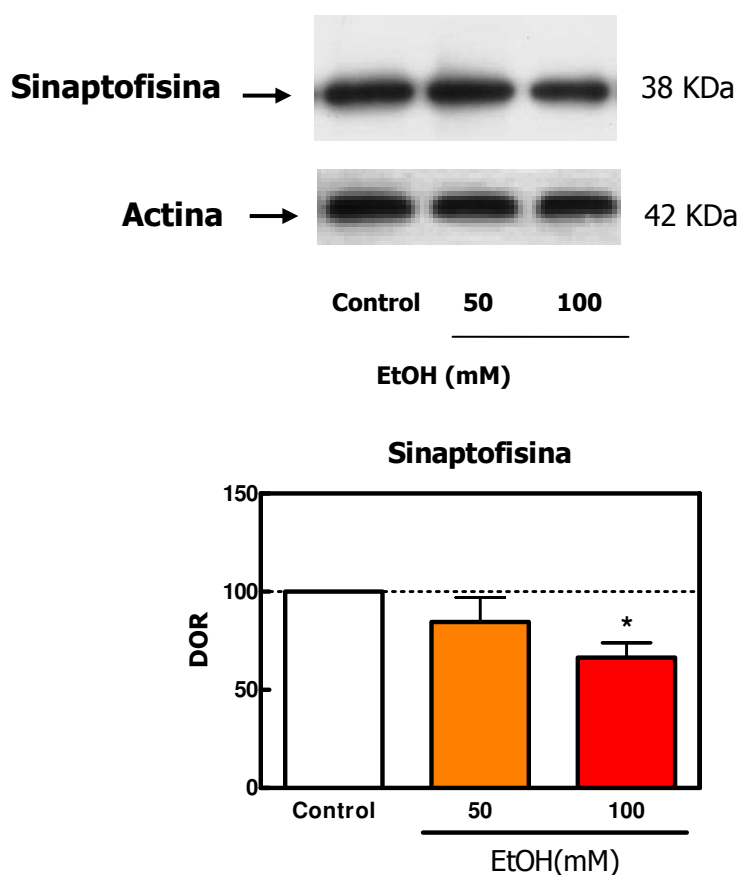


Figura 28. La exposición a EtOH 100mM reduce la expresión proteica de sinaptofisina en cultivos neuronales corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*. Contenido proteico de sinaptofisina en cultivos neuronales corticales incubados en ausencia (Control) y presencia de EtOH 50 y 100 mM durante 24 hs. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría óptica y se expresó como porcentaje del valor medido en condiciones basales (Control), al cual se le asignó un valor de 100%. Los datos representados por cada barra representan la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. * $p < 0,05$.

Cuando se determinó el contenido proteico de sinaptofisina en fracciones totales de homogeneizados de neuronas corticales de 14 días de crecimiento *in vitro* expuestas a EtOH 50 mM y 100 mM, se observó una reducción estadísticamente significativa en la densidad óptica en las neuronas expuestas a EtOH 100 mM (54 ± 13 %) con respecto al control (**Fig. 29**).

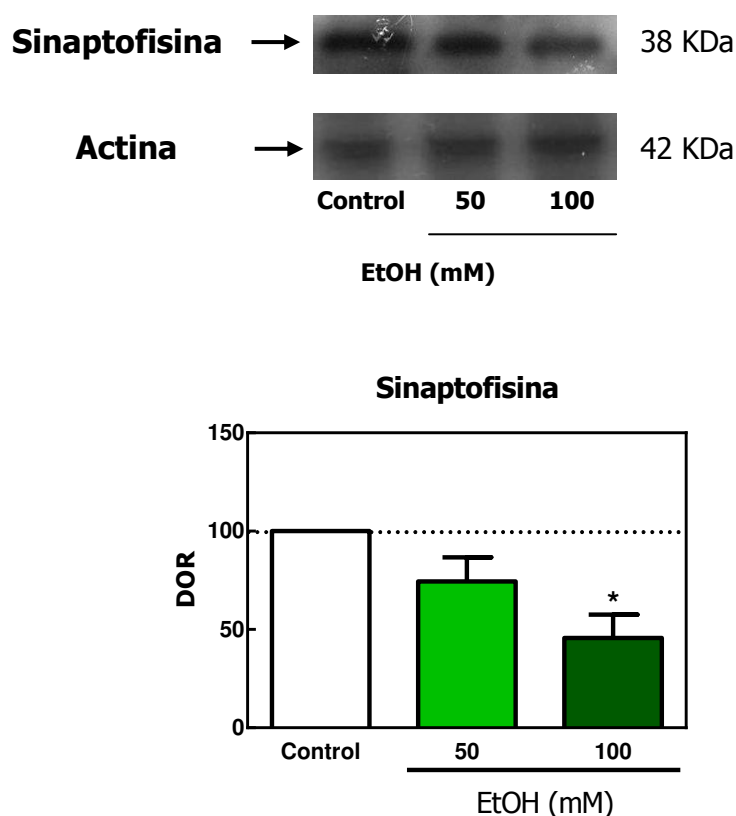


Figura 28. La exposición a EtOH 100mM reduce la expresión proteica de sinaptofisina en cultivos neuronales corticales de 14 días de crecimiento *in vitro*. Contenido proteico de sinaptofisina en cultivos neuronales corticales incubados en ausencia (Control) y presencia de EtOH 50 y 100 mM durante 24 hs. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría óptica y se expresó como porcentaje del valor medido en condiciones basales (Control), al cual se le asignó un valor de 100%. Los datos representados por cada barra representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes. Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. * $p < 0,05$.

4.7.2. Efecto del EtOH sobre el contenido proteico de PSD-95

La PSD-95 es una proteína de anclaje postsináptico que recluta componentes para la señalización en la sinapsis (Kim y Sheng, 2004) y promueve la maduración de las espinas dendríticas (El-Husseini y col., 2000).

Cuando evaluamos el efecto de EtOH sobre el contenido de la proteína PSD-95 observamos que las neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*, expuestas a EtOH 50 y 100 mM, presentaron una disminución estadísticamente significativa del contenido proteico de PSD-95 con respecto al control ($41 \pm 13\%$ para EtOH 50mM y $40 \pm 5\%$ para EtOH 100mM) (**Fig. 30**).

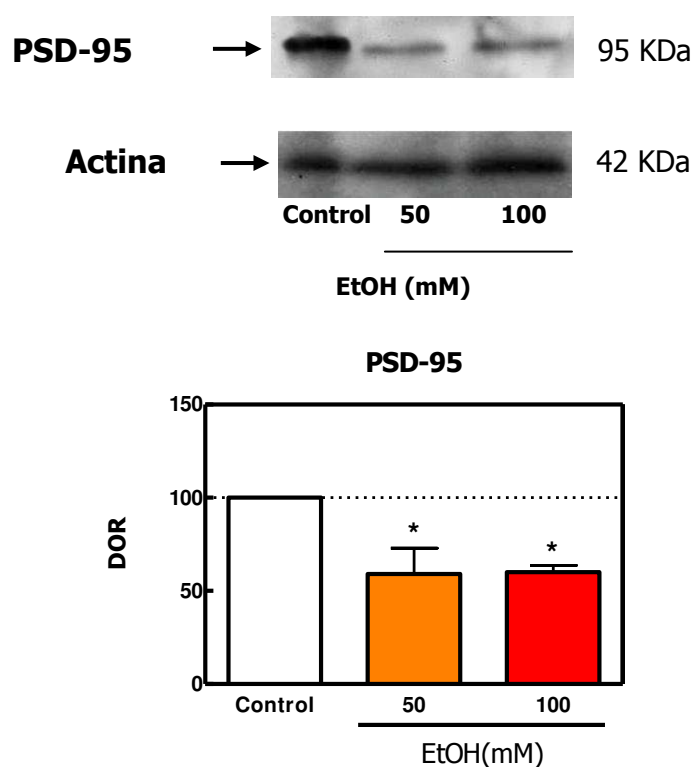


Figura 30. La exposición a EtOH reduce el contenido proteico de PSD-95 en cultivos de neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*. Contenido proteico de PSD-95 en cultivos neuronales corticales incubados en ausencia (Control) y presencia de EtOH 50 y 100 mM durante 24 hs. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría óptica y se expresó como porcentaje del valor medido en condiciones basales (Control), al cual se le asignó un valor de 100%. Los datos representados por cada barra representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. * $p < 0,05$.

Cuando estudiamos la expresión de PSD-95 en cultivos de neuronas corticales de 14 días de crecimiento *in vitro* observamos que el EtOH no produjo cambios en la expresión de dicha proteína (**Fig. 31**)

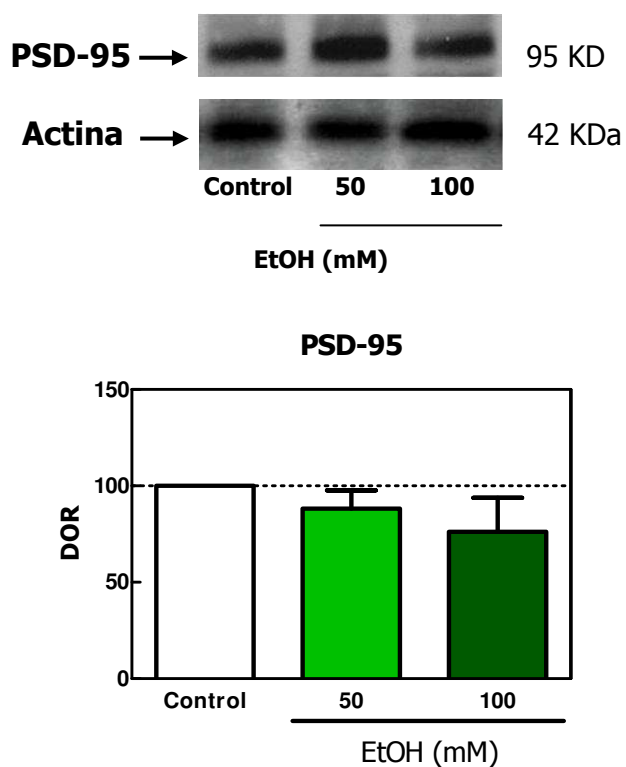


Figura 31. La exposición a etanol no afecta la expresión de PSD-95 en cultivos de 14 días de crecimiento *in vitro*. Contenido proteico de PSD-95 en cultivos neuronales corticales incubados en ausencia (Control) y presencia de EtOH 50 y 100 mM durante 24 hs. La intensidad de las bandas se cuantificó por densitometría óptica y se expresó como porcentaje del valor medido en condiciones basales (Control), al cual se le asignó un valor de 100%. Los datos representados por cada barra representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes Determinado con un ANOVA de una vía y post test de Dunnett's. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.8. Efecto del EtOH sobre la ultraestructura neuronal

4.8.1. Ultraestructura de las neuronas corticales

Se analizó la ultraestructura de neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro* expuestas a EtOH 50 mM durante 24 hs. Se utilizó como grupo control cultivos neuronales sometidos a las mismas condiciones experimentales en ausencia de EtOH (**Fig 32 y 33 a**).

En los cultivos controles se observó una morfología neuronal normal con organelas manteniendo las características ultraestructurales de las observadas en los estudios realizados *in vivo*.

Tal como se observa en la **figura 32 y 33 b**, las neuronas expuestas a EtOH presentaron en el citosol "cuerpos multilamelares o en degeneración" fácilmente identificables como membranas enrolladas sobre sí mismas formando una estructura redondeada de aspecto laminar, indicativo de cuerpos de degeneración (*), núcleos indentados y aumento en el número de gotas de lípidos (**L**). El Aparato de Golgi (**G**) en el caso de las neuronas controles muestra estructura normal con sus sacos paralelos pudiendo distinguir zona cis y trans (**Fig. 34 c**), mientras que en las neuronas tratadas con EtOH estos se presentaron con luz dilatada, desorganizados y en forma de anillo (**Fig. 34 d**). En lo que respecta a las mitocondrias de las neuronas corticales expuestas a EtOH, estas presentaron una apariencia irregular y desorganización de sus crestas mitocondriales (**Fig. 34 b**). Asimismo, se observó gran cantidad de lisosomas y un aumento del lumen del retículo endoplasmático (**RE**) (**Fig. 34b**).

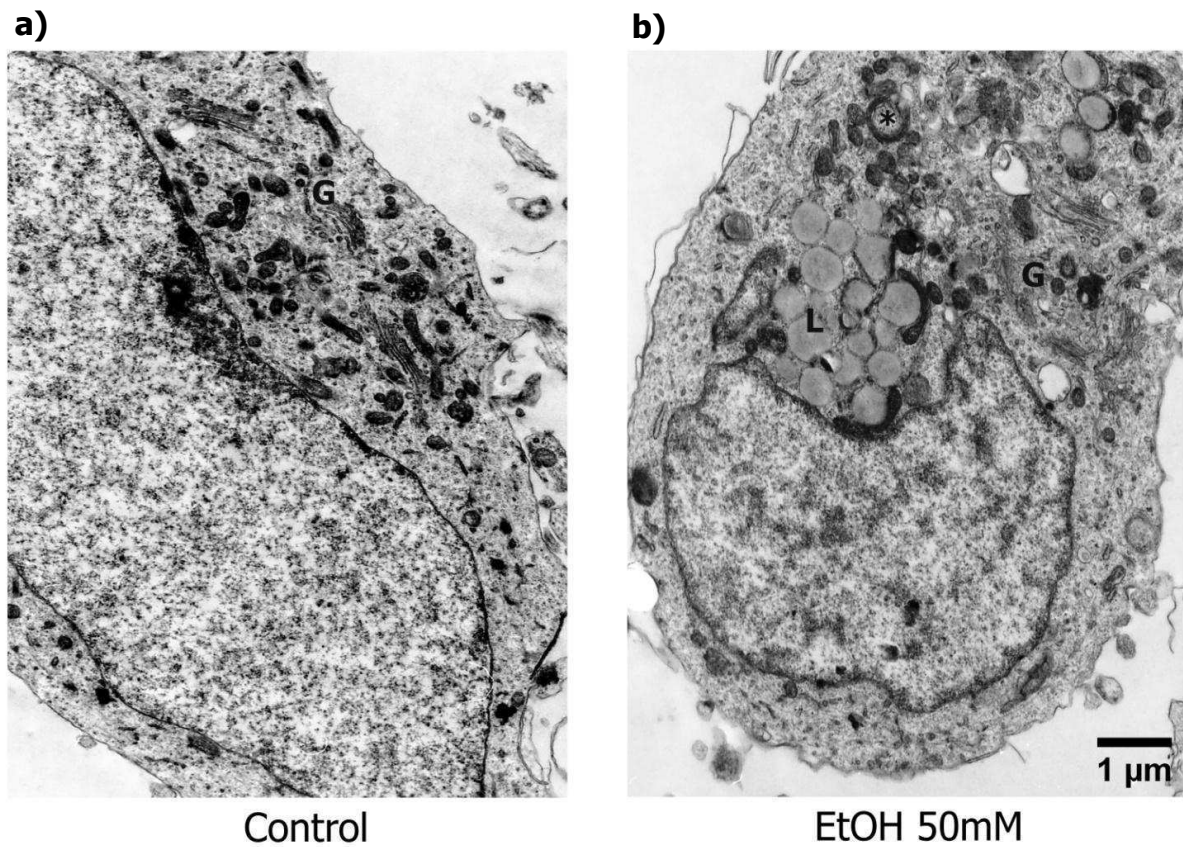


Figura 32. Morfología nuclear de neuronas corticales primarias Fotomicrografías electrónicas de transmisión de neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*, incubadas en ausencia (a) Control y (b) presencia de 50mM de EtOH. En (b) neurona expuesta a EtOH se observa el núcleo indentado, presencia de gotas de lípidos (L), cuerpos multilamelares (*) y aparato de Golgi (G) en forma de anillo.

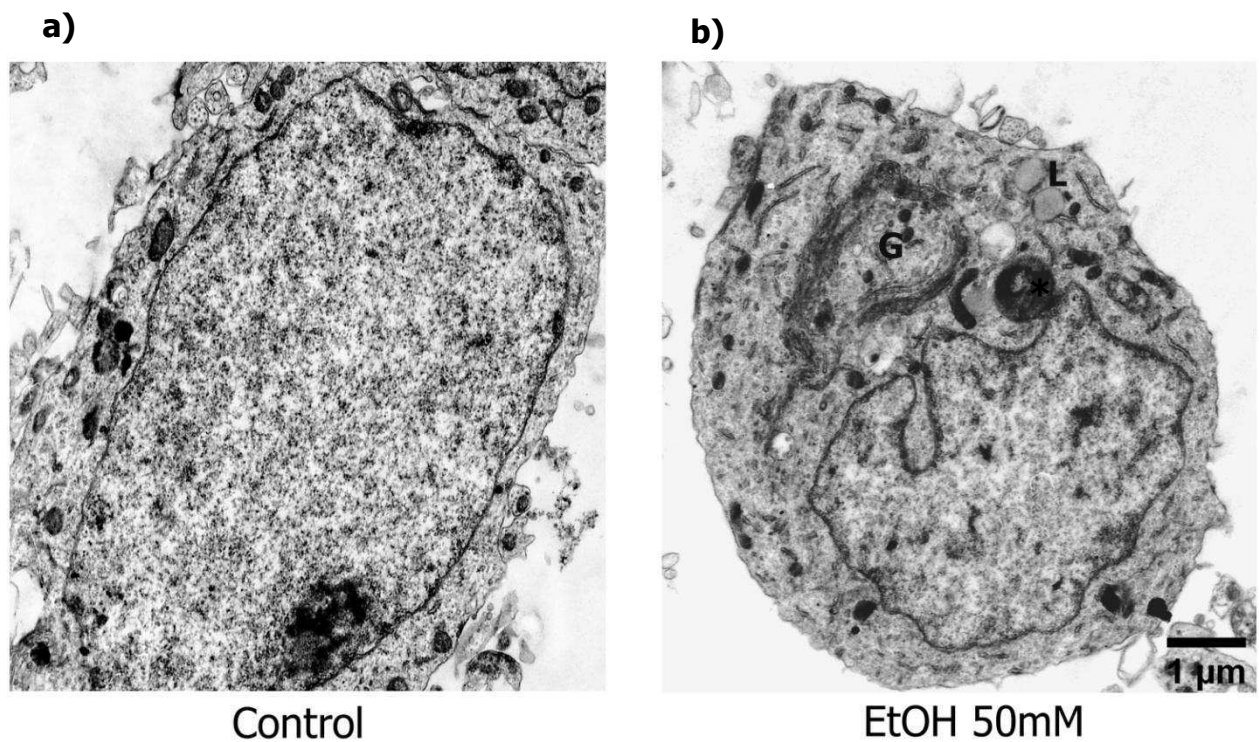


Figura 33. Morfología nuclear de neuronas corticales primarias Fotomicrografías electrónicas de transmisión de neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*, incubadas en ausencia (a) Control y (b) en presencia de 50mM de EtOH. En (b), neurona expuesta a EtOH, se observa el núcleo indentado, presencia de gotas de lípidos (L), cuerpos multilamelares (*) y aparato de Golgi (G) en forma de anillo.

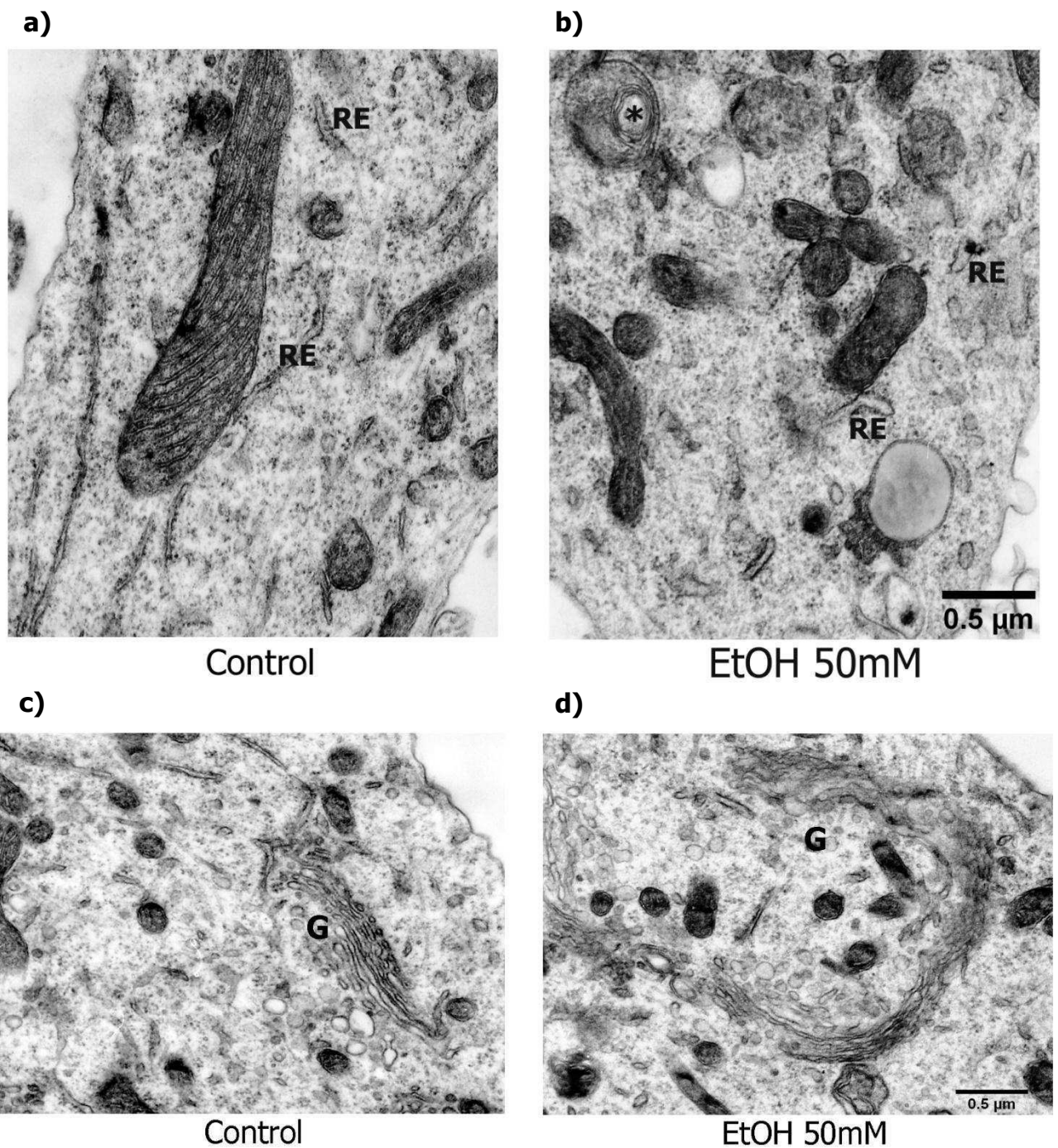


Figura 34. Estudio de la ultraestructura de las neuronas corticales primarias. Fotomicrografías electrónicas de transmisión de neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*, incubadas en ausencia (**a y c**) Control y (**b y d**) en presencia de EtOH 50mM. En (**b**), neuronas expuestas a EtOH, se observan mitocondrias con crestas desorganizadas, cuerpos multilamelares (*), el lumen del retículo endoplasmático dilatado (**RE**) y en (**d**) aparato de Golgi (**G**) desorganizado y en forma de anillo.

4.8.2. Ultraestructura de la sinapsis en cultivos primarios neuronales

Se investigó la ultraestructura de las conexiones que se establecían entre las neuronas *in vitro* en cultivos de 7 días de crecimiento, incubadas en ausencia (control) y presencia de EtOH 50mM. Como describió Calas (1998) todos los contactos sinápticos están formados por una membrana presináptica con vesículas sinápticas, un espacio sináptico definido que es espacio extracelular y una membrana postsináptica en la membrana contigua.

En la **figura 35 a** se observó en neuronas controles la distribución clásica de las vesículas presinápticas, o sea, acumulación de vesículas en el proceso presináptico, espacio sináptico definido y membrana postsináptica. De acuerdo con nuestras observaciones el grupo de Robert y col. (2012) que estudió la ultraestructura de las neuronas corticales en cultivo demostró que las neuronas corticales en cultivo forman contactos sinápticos.

Por el contrario, en los cultivos neuronales expuestos a EtOH (**Fig. 35 b**) se observó aposición entre membranas pre y postsinápticas, sin un espacio sináptico definido, sugiriendo un retraso en la formación de las vesículas presinápticas.

Se observó la presencia de conos de crecimiento, en el caso de los cultivos controles (**Fig. 35 c**), estos presentan una estructura conservada del citoesqueleto en la que se visualizan microtúbulos en cortes transversales y longitudinales, mientras que en los cultivos tratados con EtOH esta organización se pierde ya que se ven muy pocos microtúbulos distribuidos asimétricamente a lo largo del proceso y no se distingue una aposición clara de membranas pre y postsinápticas (**Fig. 35 d**).

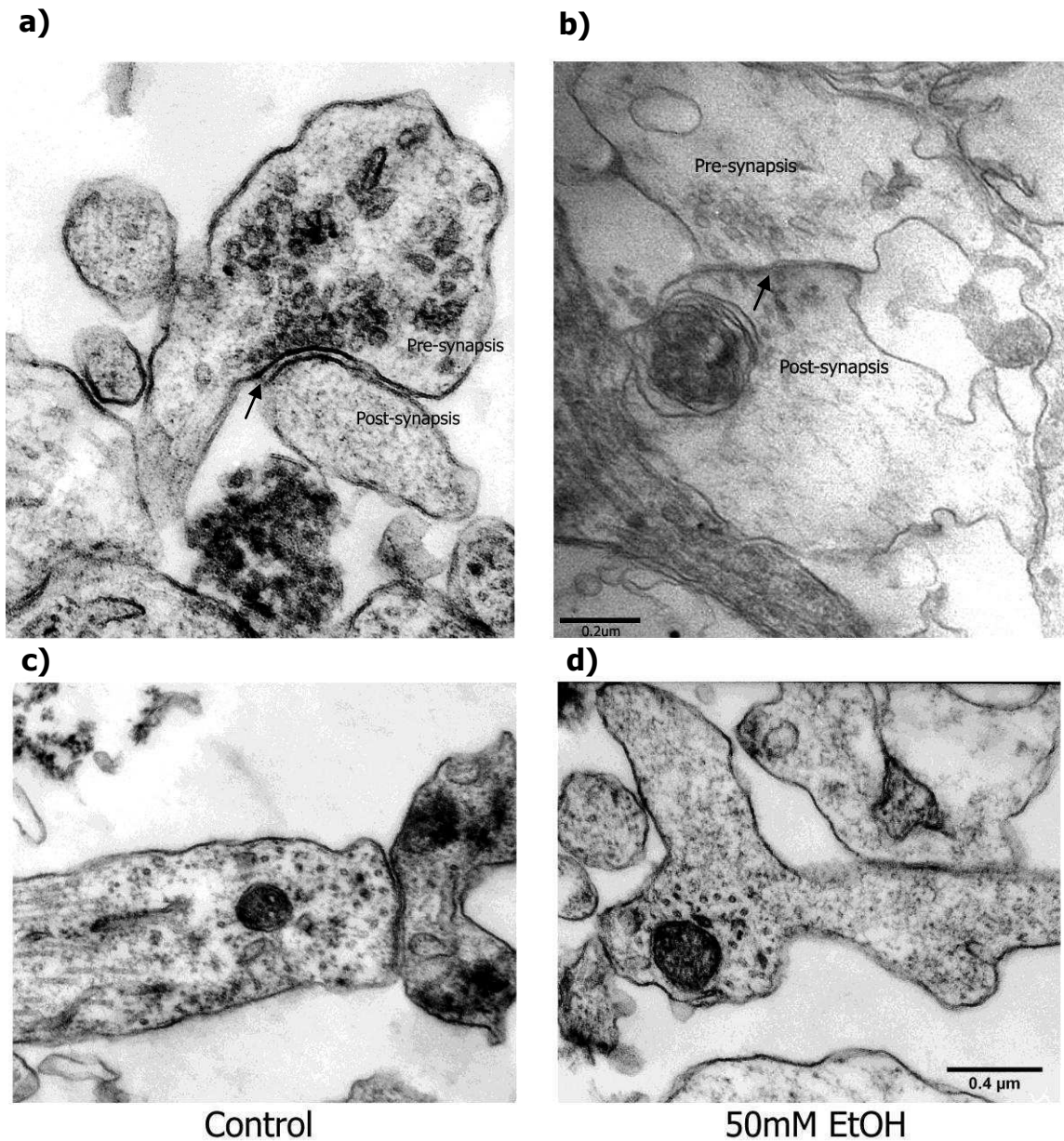


Figura 35. Estudio de la ultraestructura de la sinapsis en cultivos primarios neuronales. Fotomicrografías electrónicas de transmisión de neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*, incubadas en ausencia (**a y c**) control y (**b y d**) presencia de EtOH 50mM. En (**a**) neuronas controles se observa la distribución clásica de las vesículas presinápticas. Por el contrario, en los cultivos expuestos a EtOH (**b**) se observa aposición entre membranas pre y postsinápticas sin un espacio sináptico definido (flecha). En (**c**) cultivos neuronales controles se observa una estructura conservada del citoesqueleto del cono de crecimiento mientras que en (**d**) cultivos neuronales tratados con EtOH esta organización se pierde.

4.8.3. Número de microtúbulos (MT)

Se estudiaron las características ultraestructurales en cortes transversales de neuritas. A las prolongaciones que emiten las neuronas se las llaman neuritas porque a este nivel no se puede diferenciar dendritas de axones.

Se cuantificó en cultivos controles y tratados con EtOH 50 mM de 7 días de crecimiento *in vitro* el número de microtúbulos en cortes transversales de neuritas. Los cultivos neuronales expuestos a EtOH durante 24 hs presentaron una disminución significativa en el número de microtúbulos con respecto al control (C: 135 ± 32 MT/ μm^2 vs EtOH 50mM: 106 ± 39 MT/ μm^2) (**Fig. 36 a y b**). Además, se observó una distribución homogénea de los microtúbulos en los cortes transversales de neuritas controles (**Fig. 36 a**), mientras que en los cultivos neuronales expuestos a EtOH 50 mM la distribución de los microtúbulos fue asimétrica (**Fig. 36 b**).

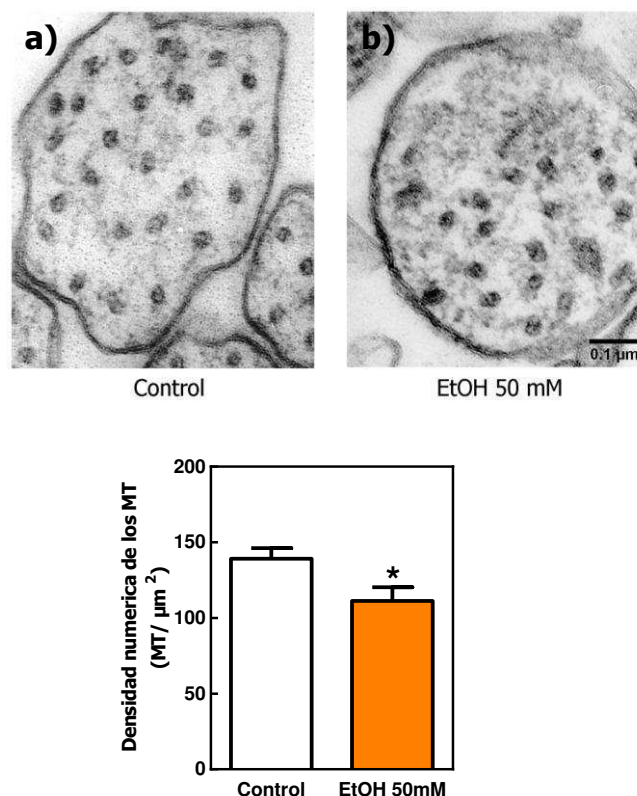


Figura 36. El tratamiento con EtOH reduce la cantidad de los microtúbulos en las neuritas.

Fotomicrografías electrónicas de transmisión de cortes transversales de neuritas de neuronas corticales de 7 días de crecimiento *in vitro*, (a) controles y (b) tratadas con EtOH 50 mM. En b se observa una distribución asimétrica de los MT en los cultivos tratados. Se vió además una disminución significativa en el número de microtúbulos de las neuritas de los cultivos tratados con EtOH. Las barras representan la media \pm Desvío estándar (DS) de tres experimentos independientes. Determinado con un test de Student. * $p < 0,01$.

DISCUSIÓN

5. DISCUSION

5.1. La exposición a EtOH afecta la viabilidad neuronal

El EtOH es un neurotóxico que afecta el SNC, cuyo efecto depende del estadio de desarrollo y del tipo celular específico. La exposición intrauterina de los fetos humanos al EtOH produce un amplio rango de déficits neurológicos y comportamentales (Streissguth y O'Malley, 2000; Famy y col., 1998). El mecanismo preciso por el cual, el EtOH causa cambios neuropatológicos en el cerebro en desarrollo no se ha definido completamente pero involucra un efecto directo del EtOH sobre las neuronas inmaduras. El EtOH induce la muerte de neuronas, pues son particularmente sensibles durante el periodo sinaptogenico del desarrollo del cerebro (Olney y col., 2004) caracterizado por el crecimiento de las neuritas, la formación de las sinapsis y el establecimiento de la señalización interneuronal. Este periodo de desarrollo ocurre, en humanos durante el último trimestre de gestación intrauterina y los primeros años de la vida postnatal. El último trimestre de gestación en humanos es equivalente a la primera semana de vida postnatal en los roedores, entre los días postnatal 3 y 10 después del nacimiento (Ikonomidou y col., 2000; Dobbing y Sands, 1973; Dobbing y Sands 1979). Se ha demostrado que la exposición a EtOH durante los primeros días postnatales (2-9) causa neuroapoptosis de las células de Purkinje y de las células de la granulosa del cerebelo en ratones (Wozniak y col., 2004; Dikranian y col., 2005)

Se sabe que el consumo materno de alcohol puede dañar el cerebro en desarrollo tanto en humanos como en modelos animales de experimentación. Uno de los mecanismos involucrados en la exposición a EtOH es la reducción en el número de neuronas en varias regiones del cerebro como, la corteza cerebral, el hipocampo, el cerebelo y el bulbo olfatorio. Esta respuesta puede también reflejar alteración en la migración neuronal y aumento de muerte celular (Akbar y col., 2006; Bhavé y col., 2000; Cheema y col., 2000; Dikranian y col., 2005; Miller, 1996; Nowoslawski y col., 2005; Vangipuram y col., 2008; Vaudry y col., 2002; Guerri y col., 2009). En nuestro laboratorio se desarrollo previamente a este trabajo un modelo *in vivo* de exposición crónica a EtOH que intentó reproducir las principales características del SAF, observándose una reducción en el espesor de la corteza cerebral y en la organización cortical en las crías de rata de madres alcohólicas. La exposición a dosis moderadas de EtOH durante la preñez y lactancia produjo modificaciones conductuales (efecto

ansiolítico y disminución del número de exploraciones aéreas) que se correlacionan con el AMF en humanos. (Arrone y col., 2011).

Numerosas evidencias demuestran que el EtOH daña a diferentes células (Blasiak y col., 2000; Navasumrit y col., 2001) y en particular a las neuronas (Singh y col., 1995; Vaudry y col., 2002) dependiendo en todos los casos de las condiciones de exposición. Con el fin de analizar el efecto directo del EtOH sobre las neuronas corticales en desarrollo expusimos los cultivos primarios de neuronas corticales a tres concentraciones de EtOH en dos estadios distintos de su desarrollo, a los 7 y a los 14 días de crecimiento *in vitro*.

Nuestros resultados demuestran que el EtOH reduce la viabilidad celular tanto en los cultivos tratados a los 7 días como a los 14 días. Estos resultados no concuerdan con lo observado en un trabajo previo de otros autores (Lamarche y col., 2003) en el que la exposición a EtOH 20, 50 y 100 mM no afectó la viabilidad celular luego de 6 horas de tratamiento y utilizando DMEM/Ham's F12 suplementado con transferrina humana. La diferencia con nuestros resultados pueden deberse a que en nuestro caso las neuronas fueron expuestas durante 24 hs. Por otro lado, Mikami y col. (1997) no observaron una pérdida significativa en la viabilidad luego de 6 horas de tratamiento con EtOH (12.5–200 mM) en una línea celular derivada de tejido conectivo de ratón (L929). Sin embargo, el número de células disminuyó luego de 26 horas de tratamiento con 200 mmol/l EtOH. Además, Mitchell y col. (1999) habían demostrado una reducción de neuronas hipocámpales de rata en cultivo que dependía de la concentración de EtOH después de una larga exposición aguda a EtOH (16 h) a dosis relativamente altas (90 a 540 mmol / l). En concordancia con nuestros resultados, el grupo de Ullah y col. (2012) demostró en cultivos de neuronas corticales expuestas a EtOH 100mM una disminución en la viabilidad celular luego de 12 horas de tratamiento.

5.2. Concentración de EtOH en sangre vs. Concentración de EtOH en el medio de cultivo

Es difícil correlacionar directamente la concentración de una administración aguda de EtOH *in vitro* con los niveles de alcohol en sangre de un modelo *in vivo*.

La tasa de alcoholemia máxima depende de la dosis y el patrón de exposición. La medición de los niveles de alcoholemia se define como la cantidad de alcohol por unidad de volumen de sangre (expresada en mg/dl) determinada normalmente entre 2 y 4 horas después de la exposición, cuando la concentración de EtOH en sangre (BEC)

alcanza el pico máximo en la circulación (Serbus y col., 1986). La exposición aguda (tasa de alcoholemia superior a 200 mg/dl) se asocia con un aumento de la neurotoxicidad, aunque un solo episodio de consumo excesivo de EtOH también ha demostrado tener efectos deletéreos (Parnell y col., 2009). La gestación y el desarrollo en los roedores se diferencian de los humanos, y esto tiene que ser considerado al momento de interpretar los resultados experimentales.

Los cultivos celulares, tales como los de hepatocitos y astrocitos, se han utilizado para examinar los efectos del EtOH, y se ha dilucidado que la exposición a EtOH en el rango 20-217 mM durante varios días inhibe la proliferación celular (Higgins, 1987; Cook y col., 1990a; Adickes y col., 1990, 1993; Davies y Cox, 1991; Devi y col., 1993) y la síntesis o cantidad de ADN (Guerri y col., 1990; Snyder y col., 1992; Adickes y col., 1993; Devi y col., 1993; Wimalasena, 1994). El EtOH altera la integridad celular (Acosta y col., 1986; Devi y col., 1993), la síntesis de proteínas (Acosta y col., 1986; Kennedy y Mukerji, 1986; Guerri y col., 1990; Adickes y col., 1993; Lokhorst y Druse, 1993a, b) y frena el ciclo celular (Higgins, 1987; Guerri y col., 1990; Cook y col., 1990a, b; Cook y Keiner, 1991). Estudios *in vitro* usando células de la granulosa del cerebelo demostraron que el tratamiento con EtOH en el rango entre 200-800 mg/dl causa muerte celular de manera concentración dependiente (Castoldi y col., 1998; Zhang y col., 1998a; 1998b; Bhavé y col., 1999; Oberdoerster y Rabin, 1999; Saito y col., 1999; Vaudry y col., 2002; Bhavé y Hoffman, 1997; Siler-Marsiglio y col., 2004; Tizabi y col., 2005). Así mismo, Druse y col. (2005) demostraron en neuronas romboencefálicas fetales que el tratamiento con EtOH 50mM por 24 horas aumenta significativamente la apoptosis. Dicha concentración de EtOH en el medio de cultivo correspondería a una concentración de EtOH en sangre de aproximadamente 230 mg/dl.

En base a los resultados de otros grupos de trabajo decidimos tratar a los cultivos de neuronas corticales con tres concentraciones crecientes de EtOH:

- EtOH 25mM se correlacionaría a una concentración de EtOH en sangre de 115 mg/dl alcoholemia baja. Los valores mayores a 80 mg/dl (>17.4 mmol/l) dan alcoholemias positivas para los conductores en la mayoría de los países.

- EtOH 50mM se correlacionaría a una concentración de EtOH en sangre de 230 mg/dl alcoholemia moderada a alta, según estudios previos se encontró que el mayor impacto tóxico se vio en el momento en que la concentración de EtOH en sangre fue mayor a 45 mM (Ikonomidou y col., 2000).

•EtOH 100mM se correlacionaría a una concentración de EtOH en sangre de 460 mg/dl alcoholemia muy alta, los valores mayores a 300-400 mg/dL (65.1-86.8 mmol/L) son potencialmente letales.

5.3. La exposición a EtOH induce muerte celular: apoptosis o necrosis

En la práctica es muy difícil correlacionar el nivel de alcohol consumido con la inducción de muerte neuronal por EtOH (Nordmann y col., 1992). Particularmente, la influencia que ejerce la duración de la exposición y la dosis es necesario que continúen siendo debatidas.

La morfología nuclear fue evaluada mediante la utilización simultánea de NA y BrEt. Este método se eligió por su simplicidad, economía y rapidez; permitiendo estudiar características morfológicas de la apoptosis y la integridad de la membrana celular a la vez. Una de las ventajas de esta técnica es que no requiere pasos de fijación evitando los posibles artefactos que dichos pasos pueden producir (Renvoize y col., 1998). Una de las desventajas de este método es que el BrEt es cancerígeno. En los cultivos de 7 días observamos que el porcentaje de células viables era menor en los cultivos tratados con EtOH 50 y 100mM, se vio además que estas mismas concentraciones aumentaron el porcentaje de células apoptóticas y que con EtOH 100mM también aumentó el porcentaje de células necróticas. Previamente otros grupos demostraron que el efecto hepatotóxico del EtOH se correlaciona directamente con el tiempo de exposición y con la concentración aplicada (Thurman y col., 1999; Lieber, 2000; Lieber, 2001; Jaeschke y col., 2002). Las altas concentraciones de EtOH conducen a la muerte celular necrótica (Hoek y col., 2002), como resultado de la inducción de la citocromo P450E1 (CYP2E1) con su posterior producción de especies reactivas de oxígeno (Jaeschke y col., 2002; Mari y col., 2001; Zima y Kalousova, 2005). Curiosamente, el EtOH a bajas concentraciones causa preferentemente apoptosis (Castaneda y Kinne, 2000a; 2000b; 2004). Estos resultados si bien se obtuvieron en otro tejido, concuerdan con nuestras observaciones en las cuales la concentración más alta de EtOH (100mM) aumenta también el porcentaje de células necróticas. Por otro lado, en cultivos de explantos de corteza cerebral en desarrollo y de progenitores de la granulosa cerebelar, se demostró que la intoxicación con EtOH conduce a un aumento dosis dependiente en la apoptosis sin variación en el índice de células necróticas (Cheema y col., 2000).

Numerosos estudios sobre los efectos del EtOH sobre el ADN y la muerte celular hacen referencia a un proceso de apoptosis. Por ejemplo, Vaudry y col. (2002) mostraron, después de la exposición *in vitro* a EtOH, un aumento en el ladder de ADN y en la actividad de caspasa 3 asociado con una disminución de la actividad mitocondrial. Es bien sabido, que estas tres observaciones son características de un mecanismo apoptótico. En otro estudio *in vitro*, Moulder y col. (2002) encontraron que el tratamiento crónico con EtOH (6 días, 100 mmol / l) indujo la muerte de las neuronas del hipocampo de una manera dependiente de la concentración. Un aumento en el número de células TUNEL-positivas había sido previamente reportado en cerebros neonatales tras una exposición *in vivo* a EtOH y en neuronas corticales en cultivo (Maffi y col., 2008). Nosotros utilizamos la técnica de TUNEL para estudiar la fragmentación del ADN *in situ*, y observamos en los cultivos de 7 días que el tratamiento con EtOH 50 y 100mM aumentan el porcentaje de células TUNEL-positivas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con la tinción con BrEt y NA, en donde las mismas concentraciones aumentan el porcentaje de células con morfología nuclear compatible con núcleos apoptóticos. El grupo de Ullah y col. (2012) demostró en cultivo primario de neuronas corticales que la exposición a EtOH 100mM durante 12 horas aumentó el número de neuronas TUNEL-positivas en un 58% con respecto al control. En este caso, las células fueron tratadas luego de 4 días de crecimiento *in vitro*. En nuestro caso, los cultivos de 7 días tratados con EtOH 100mM durante 24 hs mostraron un aumento del 41% de células TUNEL+.

Así mismo, se observó en los cultivos de 14 días que las tres concentraciones de EtOH utilizadas (25, 50 y 100mM) aumentaron el porcentaje de células TUNEL-positivas. Para estudiar si había diferencia con respecto al día en que los cultivos eran tratados con EtOH comparamos los resultados obtenidos en los cultivos tratados a los 7 días y a los 14 días. Demostrando que los cultivos tratados a los 14 días eran más sensibles al efecto neurotóxico del EtOH.

5.4. ¿El momento de la exposición a EtOH modifica la sensibilidad al daño?

La diferenciación neuronal es un fenómeno complejo caracterizado por el desarrollo y especificación molecular de dendritas y axones, el tiempo en el cual se forman es crítico para el desarrollo de circuitos normales. Una de las características claves del SAF incluyen reducción en el número de neuronas, una disminución de neuronas normales y de la conectividad sináptica en el hipocampo y en otras regiones

del cerebro (Berman y Hannigan, 2000; Pentney y Miller, 1992; Stratton y col., 1996). Sin embargo, no todas las neuronas son igualmente susceptibles al daño inducido por el EtOH, aún dentro de la misma zona del cerebro. El resultado de varias investigaciones en modelos de SAF en roedores sugieren que existen periodos transitorios después del desarrollo postmitótico donde poblaciones neuronales particulares son especialmente sensibles a los efectos proapoptóticos y citotóxicos del EtOH. Estudios de Ikonomidou y col. (2000) han mostrado en cerebro de rata en desarrollo que las neuronas de varias regiones son más vulnerables al daño inducido por el EtOH en estadios sinaptogénicos más que en estadios previos o tardíos a dicho desarrollo.

Por ejemplo, Lindsley y col. (2002) observaron en cultivo primario de neuronas piramidales hipocámpales que la adición de EtOH al día siguiente de la siembra (DIV 2), cuando la mayoría de las neuronas habían desarrollado un axón, no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia hasta 14 días *in vitro*. Sin embargo, la adición de EtOH en el DIV 6, después de que comenzó el rápido crecimiento de dendritas y formación de sinapsis, resultó en la pérdida de aproximadamente un tercio de las neuronas a los 14 días (DIV 14).

Bonthius y West (1990) demostraron que las células de Purkinje de cerebelo de rata en desarrollo eran más vulnerables a la pérdida inducida por EtOH cuanto más maduras al momento de la exposición a EtOH. En contraste, se vio en cultivo primario de cerebelo de rata que el número de células granulares disminuía si la exposición a EtOH ocurría después de la siembra, en estadios inmaduros sugiriendo una reducción en la vulnerabilidad inducida por el EtOH con el tiempo (Pierce y col., 1989; Pantazis y col., 1993). Así mismo, Luo (2012) ha reportado que la vulnerabilidad de las células de la granulosa cerebelar a la muerte inducida por EtOH disminuye cuando la célula madura. El grupo de Lewandowska y col. (2012) estudió en crías de rata expuestas a EtOH prenatalmente y durante la lactancia las alteraciones producidas en el cerebelo en desarrollo. Este estudio reveló que la administración de EtOH produce un retraso en la maduración de las células de Purkinje. Así mismo, el grupo de Marcussen y col. (1994) había mostrado que las células de Purkinje en desarrollo eran más vulnerables al daño inducido por el EtOH durante la diferenciación más que durante la neurogénesis.

Durante mucho tiempo se ha demostrado que existe una relación entre la gravedad del daño cerebral inducido por EtOH y el momento de la exposición, pero los mecanismos que subyacen a esta mayor sensibilidad aún no han sido completamente dilucidados. Nosotros demostramos una diferencia en la susceptibilidad con respecto al

momento en el cual las neuronas corticales primarias fueron expuestas a EtOH. Observamos que las neuronas corticales expuestas a EtOH en estadios más avanzados (DIV 14) eran más vulnerables al efecto citotóxico del EtOH que en estadios previos (DIV 7), estos resultados coinciden con lo observado por Lindsley y col. (2002) en cultivos primarios de neuronas hipocámpales. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado recientemente por el grupo de Romero y col. (2013), que estudiaron los efectos de la exposición crónica *in vitro* a EtOH en cultivos primarios de neuronas de hipocampo tratadas con EtOH 30mM desde el momento de la siembra hasta el DIV 7 o 14. Cuando compararon los cultivos controles de DIV 7 y 14, encontraron que el número de espinas dendríticas aumentaba con el tiempo de cultivo. Sin embargo, la exposición a EtOH disminuía el número de espinas dendríticas en ambas poblaciones celulares (DIV 7 y 14) en comparación con los cultivos controles. Estos resultados coinciden con estudios previos realizados *in vivo* (Cui y col., 2010), todas estas evidencias reflejarían un retardo en el desarrollo de estas estructuras como resultado de la exposición a EtOH.

5.5. Estudio de la cascada de señalización involucrada en el efecto neurotóxico del EtOH

La neurodegeneración presente en varios desordenes neurológicos, se asocia con una masa cerebral reducida, con alteraciones neuroconductuales y con procesos de muerte celular que involucran la activación de la caspasa 3, una proteasa que se activa tras el proceso de muerte celular apoptótica (Carlson y col., 2004; Olney y col., 2002). La apoptosis es un proceso normal en el desarrollo del cerebro, para su óptimo desarrollo más del 50% de las neuronas originales deben someterse a apoptosis (Sastray y Rao, 2000). La apoptosis involucra la activación de determinadas proteínas de la cascada de señalización como pueden ser la caspasa 9 y la caspasa 3.

En esta tesis estudiamos la expresión de caspasa 9 activa y observamos que los cultivos expuestos a EtOH 100mM en el DIV 7 presentaron un aumento en la expresión de dicha proteína no observándose cambios en los expuestos a 50mM EtOH. Estos resultados coinciden con lo obtenido por Ullah y col. (2012), donde el tratamiento con EtOH 100mM en el DIV 4 por 12 horas aumenta la expresión de caspasa 9 activa en cultivo de neuronas corticales de rata. Sin embargo, cuando los cultivos fueron tratados en el DIV 14 ambas concentraciones de EtOH (50 y 100mM) produjeron un incremento en la expresión de caspasa 9 activa. Esto se correlaciona con lo observado previamente

donde demostramos que los cultivos de 14 días eran más susceptibles al efecto neuroapoptótico inducido por el EtOH.

Se sabe que la principal acción de la caspasa 9 es la activación de caspasas ejecutoras como la caspasa 3 o la 7. La expresión de caspasa 3 activa en los cultivos tratados con EtOH 100mM en el DIV 7 mostró un incremento sin observarse cambios en los expuestos a EtOH 50mM. Lo mismo fue observado por Ullah y col. (2012), donde el tratamiento con EtOH 100 mM en el DIV 4 por 12 horas aumentó también la expresión de caspasa 3 activa. En los cultivos de 14 días se observó lo mismo que para caspasa 9 activa ya que ambas concentraciones aumentaron la expresión de caspasa 3 activa. Estos resultados son coherentes ya que la caspasa 9 se encuentra río arriba de la caspasa 3.

5.6. Efecto de la exposición a EtOH sobre la morfología neuronal

La posibilidad de la existencia de “ventanas de vulnerabilidad” para los efectos del EtOH en el desarrollo de las neuronas no ha sido aun explorado desde el punto de vista morfológico en cultivos primarios de neuronas corticales. Los modelos *in vitro* son ideales para estudiar los estadios específicos de vulnerabilidad al EtOH de las neuronas en desarrollo por permitir focalizar el estudio en dichos mecanismos superando las dificultades que tiene el análisis celular en la complejidad del tejido en el cerebro en desarrollo *in vivo*. Usamos cultivos primarios de neuronas corticales de baja densidad donde la morfogénesis de las dendritas de cada neurona individualmente pudo ser examinada. Al igual que sus homólogos *in vivo*, las neuronas en estos cultivos desarrollan axones y dendritas en una secuencia estereotipada de eventos y forman sinapsis entre sí (Goslin y col., 1998). Las neuronas se unen al sustrato dentro de 1-2 horas después de la siembra. Dentro de aproximadamente las primeras 12 horas, la mayoría de las neuronas desarrollan varias neuritas cortas y carecen de un axón definido o de dendritas típicas; en aproximadamente 24 horas uno de los procesos se extiende rápidamente y se convierte en el axón de la célula. Varios días después, las neuritas cortas restantes se alargan y adquieren las características moleculares y la forma de las dendritas y las sinapsis se forman rápidamente (Dotti y col., 1988; Fletcher y col., 1991).

Evidencias anteriores sugieren que algunas de las manifestaciones neuropatológicas del SAF son el resultado de la interrupción de la neuromorfogenesis y de la sinapsis en el hipocampo. Yanni y Lindsley (2000) han mostrado en cultivo de neuronas hipocámpales que el tratamiento con EtOH (200, 400 o 600 mg/dl) durante

seis días, comenzado en el momento de la siembra, provocó una disminución en la longitud del árbol dendrítico, en el número de dendritas por célula, en la longitud media de las dendritas y el número de sinapsis por dendrita pero no se observó efecto sobre la supervivencia celular. La disminución en el número de sinapsis se correlacionó con la longitud de las dendritas, lo que sugiere que los efectos del EtOH sobre el número de sinapsis es un efecto secundario al efecto sobre la dendritogénesis.

En este trabajo, los cultivos expuestos a EtOH 50 y 100mM en el DIV 7 mostraron una disminución en la longitud del árbol dendrítico. Esta disminución del árbol dendrítico es el resultado de una reducción en el largo de las dendritas primarias y secundarias y a una reducción en el número de dendritas secundarias (para EtOH 100mM). Estos resultados coinciden con hallazgos previos sobre un efecto inhibitorio del EtOH sobre el largo del árbol dendrítico en hipocampo (Davies y Smith, 1981; 1990), neocorteza (Hammer y Scheibel, 1981) y cerebelo (Smith y col. 1986) de roedores expuestos prenatalmente a EtOH. Pascual y Guerri (2007) demostraron en co-cultivos de neuronas corticales y de astrocitos provenientes de madres expuestas prenatalmente a EtOH una reducción en longitud del árbol dendrítico, en el largo del axón, en el largo de las dendritas secundarias y en el número de dendritas primarias y secundarias por célula.

En los cultivos expuestos a EtOH 50 y 100mM en el DIV 14 se observó también una reducción en la longitud del árbol dendrítico. Dicha reducción es también el resultado de la disminución del largo de las dendritas primarias y secundarias, y del número de dendritas secundarias.

Estudios recientes del grupo de Hamilton y col. (2010) utilizando un modelo de exposición moderada a EtOH en rata ha revelado una reducción en la longitud y ramificación de las dendritas, y en la densidad de las espinas en neuronas corticales frontales de animales adultos. El grupo de Rice y col. (2012) demostró que la exposición prenatal a niveles moderados de EtOH se asoció a una reducción importante en las ramificaciones dendríticas y en la longitud de las neuronas espinosas medianas (MSNs) en el núcleo accumbens. Estas observaciones no reflejan una reducción generalizada, ya que no se observaron diferencias en otras regiones del cuerpo estriado analizadas como el cuerpo estriado dorsolateral (DLS), y el cuerpo estriado dorsomedial (DMS).

Tomados en conjunto con hallazgos anteriores, estos resultados demuestran que el EtOH afecta el crecimiento dendrítico en un modelo de cultivo primario de neuronas que son vulnerables a las anomalías citoarquitecturales inducidas por EtOH durante el desarrollo *in vitro*.

5.7. Efecto de la exposición a EtOH sobre proteínas sinápticas

La exposición a EtOH reduce el número y la longitud de las dendritas, estos resultados sugieren que el número de sinapsis podría también alterarse como resultado de la exposición a EtOH.

Mediante el reconocimiento de ciertas proteínas sinápticas con la utilización de anticuerpos específicos, se puede cuantificar el cambio de densidad de vesículas sinápticas de las células en cultivo, lo que permite inferir cambios en la actividad sináptica durante el desarrollo de estas células, así como la maduración funcional de la neurona.

Se ha reportado que la sinaptofisina es una de las primeras proteínas sinápticas que se expresan en el desarrollo de la sinapsis en cultivo y su expresión es mayor durante la sinaptogénesis (Fletcher y col., 1991). La expresión de sinaptofisina fue compatible con su papel en la regulación de la formación de sinapsis en cultivo de neuronas del hipocampo (Tarsa y Goda, 2002). Aunque los resultados de Tarsa y Goda (2002) mostraron ausencia de diferencias en los ratones sinaptofisina mutante, también indicaron que los animales pueden desarrollar anomalías si sinaptofisina se expresa en diferentes niveles en las neuronas dentro de una región específica del cerebro. Por ejemplo, se vio que pacientes con esquizofrenia muestran niveles reducidos de sinaptofisina en comparación con los individuos controles (Vawter y col., 1999). Este hecho sugiere que una reducción en los niveles sinaptofisina en un subconjunto de neuronas puede alterar los circuitos neuronales, contribuyendo así a la ontogenia de la enfermedad.

Nosotros observamos una reducción en los niveles de sinaptofisina en los cultivos tratados con EtOH 100mM en el DIV 7 y en el DIV 14, obtuvimos el mismo resultado independientemente del momento del tratamiento con EtOH. Nuestros resultados sugieren que el EtOH afecta la expresión de sinaptofisina, y que dicha reducción podría alterar la formación adecuada de circuitos neuronales, producir cambios en la actividad sináptica y en la maduración funcional de las neuronas.

En contradicción con nuestros resultados, el grupo de Barr y col. (2005) demostró que la exposición prenatal al EtOH no alteró los niveles de proteínas presinápticas en el hipocampo o los niveles de sinaptofisina en la corteza prefrontal. Sin embargo, las ratas prenatalmente expuestas a EtOH mostraron niveles

significativamente más bajos tanto de complexina I y II en la corteza prefrontal comparado con los animales control.

La PSD-95/SAP90, es un miembro de la familia de proteínas guanilato quinasa (MAGUK), asociada a membrana, es muy abundante en la densidad post sináptica y se ha propuesto que regula muchos aspectos de la transmisión sináptica (Ehrlich y Malinow, 2004; El-Husseini y col., 2000a; 2000b; Elias y col., 2006; Futai y col., 2007 ; Kim y Sheng , 2004 ; Schluter y col. , 2006 ; Schnell y col., 2002 ; Stein y col., 2003 , Xu y col., 2008) . Además el número de moléculas PSD-95 en la densidad post sináptica es \sim 10 veces mayor que el número de receptores de glutamato sinápticos (Chen y col., 2005; Nimchinsky y col., 2004), es probable que la PSD-95 también regule otros aspectos de la estructura y función de la sinapsis.

En este estudio se observó una reducción en la expresión de PSD-95 en los cultivos tratados con EtOH 50 y 100mM en el DIV 7, no observándose cambios en los cultivos tratados en el DIV 14. El grupo de Marín y col. (2010) demostró en cultivo primario de neuronas hipocámpales tratadas con EtOH 30mM desde el momento de la siembra hasta el DIV 14 una disminución en la expresión de PSD-95. En dicho caso, el efecto de la exposición crónica a alcohol sobre la PSD-95 se había informado también previamente (Mulholland y Chandler, 2007; Samudio-Ruiz y col, 2010). Cabe agregar, que en este estudio también se ha encontrado una alteración significativa en la cantidad de PSD-95 en la exposición aguda a EtOH.

El grupo de Romero y col. (2013) demostró en cultivos primarios de neuronas de hipocampo expuestas crónicamente a una concentración moderada de EtOH (30mM) durante las dos primeras semanas de cultivo una reducción en la densidad de las espinas dendríticas y una alteración en la proporción de la morfología que estas estructuras adoptan en el hipocampo, lo que estaría afectando la formación de espinas dendríticas maduras.

5.8. Efecto del EtOH sobre la ultraestructura neuronal

Estudios recientes, de Robert y col. (2012) estudiaron las características ultraestructurales de cultivos primarios de neuronas de rata demostrando que la ultraestructura de las neuronas en cultivo es muy similar a la de las neuronas *in vivo*. Además, la microscopía electrónica reveló que tiene lugar una considerable maduración neuronal *in vitro*, con extensión de neuritas y formación de redes densas que se asemejan a lo observado *in vivo*.

El presente estudio demuestra que las neuronas expuestas a EtOH 50mM en el DIV 7 presentaron cuerpos multilamelares citosólicos fácilmente identificables como laminas enrolladas sobre sí mismas formando una estructura redondeada, indicativo de procesos de degeneración que reciben el nombre de cuerpos en degeneración. Se observaron también núcleos indentados y aumento en el número de gotas de lípidos.

Estas estructuras llamadas "cuerpos en degeneración" (Dlugos, 2006a, 2006b) se han observado por microscopía electrónica en las dendritas de neuronas de Purkinje. Los cuerpos en degeneración no se ajustan a las características bien descritas de retículo endoplasmático liso (REL), mitocondrias, microtúbulos, o a los principales orgánulos de dendríticas de neuronas de Purkinje (Palay y Chan-Palay, 1974). Cuerpos en degeneración fueron previamente observados en dos estudios en los que se relacionó la exposición a EtOH con dilatación de REL tanto en ratas macho (Dlugos, 2006a) como en hembras (Dlugos, 2006b). Los cuerpos en degeneración no son exclusivos de las dendritas de las neuronas de Purkinje, estructuras similares se han observado en varias ocasiones en otras neuronas y procesos neuronales y se les ha dado una variedad de etiquetas que incluyen cuerpos densos (Babel y col., 1970), cuerpos ovoides de mielina (Pavelka y Roth, 2005), vacuolas (Feldman, 1976), inclusiones membranosas (Feldman, 1976), y membranas en etapas de destrucción (Bogolepov, 1981). Los "cuerpos en degeneración" se producen en las neuronas corticales (Feldman, 1976; Iontov y Shefer, 1991; Peters y col., 1994), neuronas de Purkinje (Chen y Hillman, 1999), y en neuronas del tronco cerebral (Casey y Feldman, 1985) y están presentes en patologías como hidrocefalia (Kriebel y col., 1993). También se los observó en la expresión crónica de tau (Hall y col., 2000), VIH (humana virus de la inmunodeficiencia) (Michaud y col., 2001), anoxia (Malunova y Samolilov, 1984) y en la intoxicación por aluminio (Wakayama y col., 1993).

La exposición prenatal a EtOH es una de las principales causas evitables de anomalías congénitas, retraso mental y trastornos del neurodesarrollo. Sin embargo, no se ha demostrado hasta el momento que un solo mecanismo sea suficiente para explicar sus variados efectos. Uno de estos mecanismos sugiere una perturbación del tráfico vesicular intracelular, incluyendo anomalías en la estructura y función del aparato de Golgi (Tomás y col., 2005; Marín y col., 2008; Esteban-Pretel y col., 2011). Varias funciones del aparato de Golgi son sensibles a la exposición a EtOH; el EtOH inhibe el tráfico de las glicoproteínas y provoca un deterioro de la exocitosis y la endocitosis (Marín y col., 2010; Megias y col., 2000). El deterioro de estas funciones celulares esenciales podría alterar la adhesividad (Greenberg, 2003) y las propiedades

quimiotrópicas (Sepulveda y col., 2011) de la neurita y producir alteraciones en la estructura del citoesqueleto neuronal y la morfología, incluyendo una reducción de tubulina polimerizada y ensamblaje de actina cuando la dendrita se extiende (Romero y col., 2010). Estudios previos a este trabajo, sugieren una relación directa entre la localización del aparato de Golgi y la polarización del crecimiento de las dendritas en la corteza y en el hipocampo (Matsuki y col., 2010; Nichols y Olson, 2010). Powrozek y Olson (2012) observaron en explantos de neuronas corticales de capa 6 (L6) expuestas a EtOH 400mg/dl por 4 o 24 hs una significativa desorientación de las células (cuerpo celular, neuritas primarias apicales y del aparato de Golgi). Las neuronas corticales de la capa 6 mostraron disrupción del aparato de Golgi y de elementos del citoesqueleto que a su vez pueden provocar perturbaciones selectivas y significativas en la formación de neuritas primaria y la polaridad neuronal. Nosotros observamos que el aparato de Golgi en las neuronas tratadas con EtOH 50mM en el DIV 7 presentaba dilatación y desorganización de sus cisternas y adquiría forma de anillo. El grupo de Esteban-Pretel y col. (2013) observó en cultivos primarios de neuronas hipocámpales expuestas crónicamente a EtOH 30mM durante 14 días que el EtOH afectaba la morfología del aparato de Golgi. Este grupo evidenció que el EtOH inducía importantes cambios en la ultraestructura del aparato de Golgi de la mayoría de las neuronas tratadas, que parecían desorganizados si se los comparaba con las neuronas controles. Vieron también, que el tratamiento con EtOH inducía fragmentación del aparato de Golgi y por lo tanto, la aparición de pequeñas cisternas e hinchazón de las mismas. El grupo de Lewandowska y col. (2012) estudió en crías de rata expuestas a EtOH prenatalmente y durante la lactancia las alteraciones ultraestructurales en el cerebelo en desarrollo observando mitocondrias hinchadas, dilatación de RER y de las cisternas del aparato de Golgi. En coincidencia con nuestros resultados, el grupo de Wenisch y col. (1997) observó lo mismo con respecto a la forma del aparato de Golgi en neuronas de Purkinje después de una exposición crónica a EtOH y posterior abstinencia, lo que puede significar degeneración. Así mismo, se observaron un número creciente de cuerpos multilamelares, que fueron posiblemente formados para superar el daño celular en un intento por sobrevivir. El grupo de Köksal y col. (2005) observó en crías de ratas expuestas prenatalmente a EtOH dilatación del RE, degeneración mitocondrial y aparición en forma de anillo del aparato de Golgi. En algunos casos, la membrana nuclear se desintegró. En el citoplasma de las células de Purkinje, se observaron cuerpos multivesiculares como los observados en nuestro estudio. Se determinó además, que la

dieta líquida que contiene 6% de alcohol tiene efectos tóxicos sobre las células de Purkinje y causó signos ultraestructurales que indican degeneración de estas células.

En lo que respecta a las mitocondrias de las neuronas corticales expuestas a EtOH, estas presentaron una apariencia irregular y desorganización de sus crestas mitocondriales comparado con las crestas organizadas de los cultivos controles. Alteraciones estructurales inducidas por EtOH en la mitocondria han sido observadas en neuronas de Purkinje de ratas jóvenes luego de 3 a 6 meses de consumo de EtOH (Tavares and Paula-Barbosa, 1983).

Asimismo, se observó gran cantidad de lisosomas y un aumento del lumen del retículo endoplasmático. Estos resultados coinciden con lo obtenido por Dlugos (2008) que observó una dilatación del REL en ratas adultas luego de una exposición crónica a EtOH.

Es sabido que la organización y la dinámica de los microtúbulos (MTs) son críticos para el desarrollo y el funcionamiento correcto de las neuronas, incluyendo el tráfico intracelular y la señalización (Govek y col., 2005; Hoogenraad y Bradke, 2009). En esta tesis se estudió la distribución y número de MTs en cortes transversales de neuritas en cultivos tratados con EtOH 50mM en el DIV 7, obteniéndose una disminución en el número de MTs, se observó también una distribución asimétrica de los MTs en dichos cultivos. Estudios previos sobre el efecto de la exposición a EtOH sobre el citoesqueleto neuronal durante la diferenciación han indicado una posible relevancia de este efecto como un mecanismo subyacente de la toxicidad del alcohol en el cerebro (Ahluwalia y col., 2000; Depaz y col., 2005; Joshi y col., 2006; Marín y col., 2008; 2010; Sordella y Van Aelst, 2006). Aquí nosotros proporcionamos nuevas evidencias para apoyar esta posibilidad, encontramos que la exposición aguda a EtOH afecta la organización de los MTs.

Nuestros resultados coinciden con lo reportado anteriormente por Romero y col. (2010), quienes demostraron una disminución en el número de MTs en secciones transversales de neuritas de neuronas de hipocampo expuesta a EtOH y una alteración en la distribución y la morfología de estos elementos en el soma y en las dendritas. Tanto el citoesqueleto de actina como los MTs juegan un papel importante en el mantenimiento de la organización y función de las dendritas y de las espinas dendríticas (Calabrese y col., 2006; Gu y col., 2008; Jaworski y col., 2009). Las características morfológicas y el número de espinas también se han modificado de manera significativa en niños y en animales experimentales expuestos prenatalmente a EtOH (Berman y

Krahl, 1996; Chen y col., 2003; Smith y Davies, 1990; Stoltenburg - Didingen y Spohr, 1983).

En los cultivos primarios de neuronas corticales hemos podido identificar contactos sinápticos típicos. De acuerdo con nuestras observaciones el grupo de Robert y col. (2012) estudio la ultraestructura de las neuronas corticales en cultivo y demostró que las neuronas corticales en cultivo forman contactos sinápticos. Ellos observaron que se formaban escasos contactos sinápticos en los cultivos de DIV 7, y había una extensa formación de ellos en los cultivos de DIV 14 y eran particularmente abundantes en los cultivos de DIV 21.

Sin embargo, en los cultivos expuestos a EtOH en el DIV 7 se observaron escasos contactos inmaduros entre procesos neuronales, estos contactos carecen de las características ultraestructurales como para clasificarlos como contactos sinápticos funcionales. Así, es claro que el EtOH no permite en los cultivos primarios el establecimiento de contactos sinápticos típicos por lo que la funcionalidad neuronal estaría afectada.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- La exposición *in vitro* a EtOH durante 24 hs afecta la viabilidad de las neuronas corticales en cultivo tratadas tanto en el DIV 7 como en el DIV 14.
- La reducción en la viabilidad se debe a que aumenta la muerte de las neuronas tanto por necrosis como por apoptosis.
- Existen diferencias en la vulnerabilidad de las neuronas corticales con respecto al momento en el cual son expuestas al EtOH, las neuronas tratadas en el DIV 14 son más sensibles al efecto neurotóxico del EtOH.
- La muerte de las neuronas corticales por apoptosis inducida por EtOH involucra la activación de caspasa 9 y de caspasa 3.
- La exposición *in vitro* a EtOH altera la morfología neuronal, reduciendo el árbol dendrítico por afectar tanto la longitud de las dendritas primarias y secundarias como el número de dendritas secundarias.
- La exposición *in vitro* a EtOH modifica la sinapsis por reducir la expresión de proteínas tanto presinápticas como postsinápticas, sinaptofisina y PSD-95 respectivamente.
- La exposición *in vitro* a EtOH produce cambios ultraestructurales en las neuronas como presencia de cuerpos multilamelares, núcleos indentados, aumento del lumen del retículo endoplasmático, del número de gotas de lípidos y de lisosomas, así como también, desorganización del aparato de Golgi y de las mitocondrias.

- La exposición *in vitro* a EtOH produjo una reducción en el número de MTs en las neuritas y cambios en la disposición de los mismos.
- Los resultados de este estudio demuestran que el momento de la exposición a EtOH en relación con eventos del desarrollo neuronal alteran los efectos del EtOH sobre el desarrollo morfológico y sobre sus efectos citotóxicos.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFIA

Acosta D, Stege TE, Erickson CK. 1986. Cytotoxicity of ethanol in primary cultures of rat midbrain neurons. *Toxicology Letters* 30, 231-235.

Adickes ED, Mollner T J , Makoid MC. 1993. Teratogenic effects of ethanol during hyperplastic growth in cardiac myocyte cultures. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 17, 988-992.

Adickes ED, Mollner TJ, Lockwood SK. 1990. Ethanol induced morphologic alterations during growth and maturation of cardiac myocytes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 14, 827-831.

Ahluwalia B, Ahmad S, Adeyiga O, Wesley B, Rajguru S. 2000. Low levels of ethanol stimulate and high levels decrease phosphorylation in microtubule-associated proteins in rat brain: an in vitro study. *Alcohol Alcohol* 35:452-457.

Akbar M, Baick J, Calderon F, Wen Z, Kim HY. 2006. Ethanol promotes neuronal apoptosis by inhibiting phosphatidylserine accumulation. *J Neurosci Res* 15;83(3):432-40.

Albala JS, Kress Y, Liu WK, Weidenheim K, Yen SH, Shafit-Zagardo B. 1995. Human microtubule-associated protein-2c localizes to dendrites and axons in fetal spinal motor neurons. *J Neurochem* 64(6):2480-90.

Alles A, Alley K, Barrett JC, Buttyan R, Columbano A, Cope FO, Copelan EA, Duke RC, Farel PB, Gershenson LE. 1991. Apoptosis: a general comment. *FASEB J* 5, 2127-8.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 18;87(2):171.

Álvarez-González FJ, Del Río Gracia C. 2003. "Farmacología del alcohol". En: Manual SET de alcoholismo -1ª Ed. – Madrid: Médica Panamericana. Pp: 109-129.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. 1997. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3(8):917-21.

Annu Rev Neurosci 24:1-29.

Aronne MP, Guadagnoli T, Fontanet P, Evrard SG, Brusco A. 2011. Effects of prenatal ethanol exposure on rat brain radial glia and neuroblast migration. *Experimental Neurology*; 229(2):364-71.

Ayesta FJ. 2002. Bases bioquímicas y neurobiológicas de la adicción al alcohol. *ADICCIONES VOL. 14, SUPL. 1.*

Babel J, Bischoff A, Spöndlin H. 1970. Ultrastructure of the Peripheral Nervous System and Sense Organs. In: Bischoff A, editor. *Atlas of Normal and Pathologic Anatomy*. Missouri. Mosby Company.

Baraona E, Abittan CS, Dohmen K, Moretti M, Pozzato G, Chayes ZW, Schaefer C, Lieber CS. 2001. Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcoholism: clinical and experimental Research* 25, 502-507.

- Barr AM, Hofmann CE, Phillips AG, Weinberg J, Honer WG. 2005. Prenatal ethanol exposure in rats decreases levels of complexin proteins in the frontal cortex. *Alcohol Clin Exp Res* 29(11):1915-20.
- Benchoua A, Couriaud C, Guégan C, Tartier L, Couvert P, Friocourt G, Chelly J, Ménissier-de Murcia J, Onténiente B. 2002. Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose) polymerase-2. *J Biol Chem* 277(37):34217-22.
- Benn SC, Woolf CJ. 2004. Adult neuron survival strategies slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci* 5, 686-700.
- Berman RF, Hannigan JH. 2000. Effects of prenatal alcohol exposure on the hippocampus (spatial behavior, electrophysiology, and neuroanatomy). *Hippocampus* 10:94-110.
- Berman RF, Krah SE. 1996. Neurophysiological correlates of fetal alcohol syndrome. In: Abel EL, editor. *Fetal Alcohol Syndrome: From Mechanism to Prevention*. Boca Raton, FL: CRC Press LLC; p. 69-84.
- Bhave SV, Ghoda L, Hoffman PL. 1999. Brain-derived neurotrophic factor mediates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons: signal transduction cascades and site of ethanol action. *J Neurosci* 19:3277-86.
- Bhave SV, Hoffman PL. 1997. Ethanol promotes apoptosis in cerebellar granule cells by inhibiting the trophic effect of NMDA. *J Neurochem* 68:578-86.
- Bhave SV, Snell LD, Tabakoff B, Hoffman PL. 2000. Chronic ethanol exposure attenuates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 75(3):1035-44.
- Blasiak J, Trzeciak A, Malecka-Panas E, Drzewoski J, Wojewodzka M. 2000. In vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde in human lymphocytes and the gastrointestinal tract mucosa cells. *Toxicology In Vitro* 14, 287-295.
- Blatt NB, Glick GD. 2001. Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorg Med Chem* 9(6):1371-84.
- Bogolepov NN. 1981. Changes in the dendrites in chronic morphine poisoning. *Arkh Anat Gistol Embriol* 81:5-11.
- Bonthius DJ, West JR. 1990. Alcohol-induced neuronal loss in developing rats (increased brain damage with binge exposure). *Alcohol Clin Exp Res* 14:107-118.
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35(5):567-57.

- Brewer GJ. 1995. Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res* 42(5):674-683.
- Brodmann K. 1909. Vergleichende. Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Leipzig: Barth.
- Caballería L, Parés A. 2000. Primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterol Hepatol* 23 Suppl 1:10-3.
- Cain K, Brown DG, Langlais C, Cohen GM. 1999. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 274(32):22686-92.
- Cajal SR. 1892. El nuevo concepto de la histología de los centros nerviosos. *Rev Ciencias Méd* 18:457-476.
- Calabrese B, Wilson MS, Halpain S. 2006. Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology* 21:38-47.
- Calas A. 1998. Les neurones. In: *Physiologie du neurone* (D Trisch, D Chesnoy-Marchais, A Feltz, eds), pp 1-29. Paris:Doin.
- Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR. 1996. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *J Neurocytol* 25(12):821-8.
- Carlioni S, Mazzoni E, Balduini W. 2004. Caspase-3 and calpain activities after acute and repeated ethanol administration during the rat brain growth spurt. *J Neurochem* 89:197-203.
- Casey MA, Feldman MI. 1985. Aging in the rat medial nucleus of the trapezoid body. II. Electron microscopy. *J Comp Neurol* 232:401-413.
- Castaneda F, Kinne RK. 2000b. Cytotoxicity of millimolar concentrations of ethanol on HepG2 human tumor cell line compared to normal rat hepatocytes in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:503-10.
- Castaneda F, Kinne RKH. 2000a. Short exposure to millimolar concentrations of ethanol induces apoptotic cell death in multicellular HepG2 spheroids. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:305-10.
- Castaneda F, Kinne RKH. 2004. Ethanol treatment of hepatocellular carcinoma: high potentials of low concentrations. *Cancer Biol Ther* 3:430-33.
- Castoldi AF, Barni S, Randine G, Costa LG, Manzo L. 1998. Ethanol selectively interferes with the trophic action of NMDA and carbachol on cultured cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *Brain Res Dev Brain Res* 111:279-89.
- mechanisms. *Anat Embryol* 181, 195-213.
- Cheema ZF, West JR, Miranda RC. 2000. Ethanol induces Fas/Apo [apoptosis]-1 mRNA and cell suicide in the developing cerebral cortex. *Alcohol Clin Exp Res* 24:535-543.

- Chen S, Hillman DE. 1999. Dying-back of Purkinje cell dendrites with synapse loss in aging rats. *J Neurocytol* 28:187–196.
- Chen WA, Maier SE, Parnell SE, West JR. 2003. Alcohol and the developing brain: neuroanatomical studies. *Alcohol Res. Health* 27:174-180.
- Chen WJ, Loh EW, Hsu Y-PP, Chen C-C, Yu J-M, Cheng ATA. 1996. Alcohol-metabolizing genes and alcoholism among Taiwanese Han Men: Independent effect of ADH2, ADH3, and ALDH2. *Br J Psychiatry* 168:762–767.
- Chen X, Vinade L, Leapman RD, Petersen JD, Nakagawa T, Phillips TM, Sheng M, Reese TS. 2005. Mass of the postsynaptic density and enumeration of three key molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11551–11556.
- Choi DW. 1995. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18(2):58-60.
- Clarke PG. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple me-
- Colombo G. 1997. ESBRA-Nordmann 1996 Award Lecture: ethanol drinking behaviour in Sardinian alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol* 32(4):443-53.
- Compton MM. 1992. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev* 11(2):105-19.
- Cook RT, Keiner J, Yen A, Fishbaugh J. 1990a. Ethanol induced growth inhibition and growth adaptation in vitro: Cell cycle delay in late G. *Alcohol and Alcoholism* 25, 33-43.
- Cook RT, Keiner JA, Yen A. 1990b. Ethanol causes accelerated G_i arrest in differentiating HL-60 cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 14, 695-703.
- Cook RT, Keiner JA. 1991. Ethanol-induced growth inhibition of erythroleukemia stem cells: Cell cycle effects. *Acta Haematologica* 86, 6-13.
- Correa G , Longart M. 2010. Análisis morfométrico del proceso de diferenciación in vitro de neuronas del hipocampo. *Invest Clin* 51(4): 501 – 518.
- Cui Z, Zhao K, Zhao H, Yu D, Niu Y, Zhang J, Deng J. 2010. Prenatal alcohol exposure induces long-term changes in dendritic spines and synapses in the mouse visual cortex. *Alcohol Alcohol* 45:312–319
- Czesak M, Burns AM, Lenicov FR, Albert PR. 2007. Characterization of rat rostral raphe primary cultures: multiplex quantification of serotonergic markers. *J Neurosci Methods* 164(1):59-67.
- Davies DL, Cox WE. 1991. Delayed growth and maturation of astrocytic cultures following exposure to ethanol: Electron microscopic observations. *Brain Research* 547, 53-61.
- de Rasor R, Youra DG. 1980. *Alcohol Distiller's manual for Gasahol and spirits*, Dona Carolina Distillers, San Antonio TX.
- death. In *Cell Death*, L.M. Schwartz, and B.A. Osborne, eds. (Academic Press), pp. 1-27.

- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Blatow M, Caputi A, Monyer H. 2005. Anatomical and molecular heterogeneity of cortical GABAergic interneurons. In: Grillner S, editor. *Microcircuits: The Interface between Neurons and Global Brain Function*. Dahlem Workshop Report 93. Cambridge: The MIT Press.
- DeFelipe J. 2002. Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res* 136:215-238.
- Depaz IM, de las Heras R, Kroon PA, Wilce PA. 2005. Changes in neuronal protein 22 expression and cytoskeletal association in the alcohol-dependent and withdrawn rat brain. *J Neurosci Res* 81:253-260.
- Deveraux QL, Reed JC. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13(3):239-52.
- Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsedale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17(8):2215-23.
- Devi BG, Henderson GI, Frosto TA, Schenker S. 1993. Effect of ethanol on rat fetal hepatocytes: Studies on cell replication, lipid peroxidation and glutathione. *Hepatology* 18, 648-659
- Diamond I, Gordon AS. 1997. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol Rev* 77:1-20.
- Dikranian K, Qin YQ, Labruyere J, Nemmers B, Olney JW. 2005. Ethanol-induced neuroapoptosis in the developing rodent cerebellum and related brain stem structures. *Brain Res Dev Brain Res* 155:1-13.
- Dlugos CA. 2006a. Smooth endoplasmic reticulum dilation and degeneration in Purkinje neuron dendrites of aging ethanol-fed female rats. *Cerebellum* 5(2):155-62.
- Dlugos CA. 2006b. Ethanol-related smooth endoplasmic reticulum dilation in purkinje dendrites of aging rats. *Alcohol Clin Exp Res* 30(5):883-91.
- Dlugos CA. 2008. Ethanol-related increases in degenerating bodies in the Purkinje neuron dendrites of aging rats. *Brain Res* 24;1221:98-107.
- Dobbing J, Sands J. 1973. Quantitative growth and development of human brain. *Arch Dis Child* 48(10):757-767.
- Dobbing J, Sands J. 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3(1):79-83.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8(4):1454-68.
- Druse M, Tajuddin NF, Gillespie RA, Le P. 2005. Signaling pathways involved with serotonin1A agonist-mediated neuroprotection against ethanol-induced apoptosis of fetal rhombencephalic neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 8;159(1):18-28.
- Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB, Armstrong RC. 1998. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c. *Mol Cell Biol* 18(1):608-15.

Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383-424.

Ehrlich I, Malinow R. 2004. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci* 24:916–927.

El-Husseini AE, Craven SE, Chetkovich DM, Firestein BL, Schnell E, Aoki C, Bredt DS. 2000b. Dual palmitoylation of PSD-95 mediates its vesiculotubular sorting, postsynaptic targeting, and ion channel clustering. *J Cell Biol* 148:159–172.

El-Husseini, A.E., Schnell, E., Chetkovich, D.M., Nicoll, R.A., and Bredt, D.S. 2000a. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science* 290, 1364–1368.

Elias GM, Funke L, Stein V, Grant SG, Bredt DS, Nicoll RA. 2006. Synapse-specific and developmentally regulated targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins. *Neuron* 52:307–320.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1;391(6662):43-50.

Esteban-Pretel G, Marín MP, Romero AM, Ponsoda J, Ballestín R, Canales JJ, Renau-Piqueras J. 2011 .Protein traffic is an intracellular target in alcohol toxicity. *Pharmaceuticals* 4:741–57.

Esteban-Pretel G, Marín MP, Romero AM, Timoneda J, Ponsoda X, Ballestín R, Renau-Piqueras J. 2013. Polyphosphoinositide metabolism and Golgi complex morphology in hippocampal neurons in primary culture is altered by chronic ethanol exposure. *Alcohol* 48(1):15-27.

Estruch R. 2002. Alcohol and the heart, two sides of the same coin. *Med Clin (Barc)* 118;118(18):696-7.

Fadda F, Rossetti ZL. 1998. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 56(4):385-431.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1;148(7):2207-16.

Fairén A, DeFelipe J and Regidor J. 1984. Non pyramidal neurons. General account. En: *Cerebral Cortex. Cellular Components of the Cerebral Cortex*. Vol. 1. Peters A, Jones EG, eds. Plenum Press, Nueva York pp. 201-253.

Famy AP, Streissguth AP, Unis AS. 1998. Mental Illness in adults with fetal alcohol syndrome or fetal alcohol effects. *Am J Psychiatry* 155: 552-554.

Famy C, Streissguth AP, Unis AS. 1998. Mental illness in adults with Fetal Alcohol Syndrome or Fetal Alcohol Effects. *American Journal of Psychiatry*, 155, 552–554.

- Feldman ML. 1976. Aging Changes in the Morphology of Cortical Dendrites. In: Terry RD, Gershon S, editors. *Aging Neurobiology of Aging*. Vol 3. New York: Raven Press; 214–227.
- Ferri KF, Kroemer G. 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3(11):E255-63.
- Fletcher TL, Cameron P, De Camilli P, Banker G. 1991. The distribution of synapsin I and synaptophysin in hippocampal neurons developing in culture. *J Neurosci* 11(6):1617-1626.
- Frezza M, di Padova C, Pozzato G, Terpin M, Baraona E, Lieber CS. 1990. High blood alcohol levels in women. The role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first-pass metabolism. *New England Journal of Medicine* 322, 95-99.
- Futai K, Kim MJ, Hashikawa T, Scheiffele P, Sheng M, Hayashi Y. 2007. Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95-neurologin. *Nat Neurosci* 10:186–195.
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19, 107-20.
- Gioacchino M, Conti P, Li QY, Niu Q. 2008. How do rat cortical cells cultured with aluminum die: necrosis or apoptosis? *Int J Immunopathol Pharmacol* 21(1): 107-115.
- Goetz and Pappert (eds). 1999. *Textbook of Clinical Neurology*. WB Saunders, Philadelphia Pp: 798-818.
- Golgi C. 1873. Sulla struttura Della sostanza grigia del cervello (Comunicazione preventiva). *Gazz. Med. Ital. Lombardia*, 33: 244-246.
- Goslin K, Asmussen H, Banker G. 1998. Rat hippocampal neurons in low-density culture. In: Banker G, Goslin K editor. *Culturing Nerve Cells*. 2nd edition. Cambridge, MA: MIT Press; p. 339–390.
- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L. 2005. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19:1-49.
- Greenberg DA. 2003. Linking acquired neurodevelopmental disorders to defects in cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8043–8044.
- Gu J, Firestein BL, Zheng JQ. 2008. Microtubules in dendritic spine development. *J Neurosci* 28:12120-12124.
- Gu X, Spitzer NC. 1995. Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca²⁺ transients. *Nature* 375(6534):784-7.
- Guerri C, SSez R, Sancho-Tello M, Martin de Aquilera E, Renau-Piqueras J. 1990. Ethanol alters astrocyte development: A study of critical periods using primary cultures. *Neurochemical Research* 15, 559-565.

Guerri C, Bazinet A, Riley E. 2009. Fetal alcohol spectrum disorders and alterations in brain and behavior. *Alcohol and Alcoholism* 44(2),108-114.

Hall GF, Chu B, Lee G, Yao J. 2000. Human tau filaments induce microtubule and synapse loss in an in vivo model of neurofibrillary degenerative disease. *J Cell Sci* 113:1373–1387.

Hamilton DA, Akers KG, Rice JP, Johnson T, Candelaria-Cook FT, Maes LI, Rosenberg M, Valenzuela CF, Savage DD. 2010. Prenatal exposure to moderate levels of ethanol alters social behaviour in adult rats: Relationship to structural plasticity and immediate early gene expression in frontal cortex. *Behav. Brain Res* 207:290–304.

Hammer RP, Scheibel AB. 1981. Morphologic evidence for a delay of neuronal maturation in fetal alcohol exposure. *Exp Neurol* 74 587–596.

Han SI, Kim YS, Kim TH. 2008. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep* 41, 1-10.

Heath DB. 1974. Perspectivas socioculturales del alcohol en América Latina. *Acta Psiquiat Pscol Amer Lat* 20: 99-111.

Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805):770-6.

Higgins P J. 1987. Cell cycle phase-specific perturbation of hepatic tumor cell growth kinetics during short-term in vitro exposure to ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 11, 550-555.

Hoek JB, Cahill A, Pastorino JG. 2002. Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship. *Gastroenterol* 122:2049-63.

Hoogenraad CC, Bradke F. 2009. Control of neuronal polarity and plasticity—a renaissance for microtubules? *Trends Cell Biol* 19:669-676.

Hunt CA, Cho K-O, Kennedy MB. 1992. Distribution of the postsynaptic density protein, PSD-95, in rat brain. *Sot Neurosci Abstr* 18:1336.

Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovská V, Horster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW. 2000. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287:1056–1060.

Iontov AS, Shefer VF. 1981. Age-related changes in the dendrites in the cat. *Arkh Anat Gistol Embriol* 81:11–16.

Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, et al. 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 65:166-76.

Jaworski J, Kapitein LC, Gouveia SM, Dortland BR, Wulf PS, Grigoriev I, Camera P, Spangler SA, Di Stefano P, Demmers J. 2009. Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* 61:85-100.

- Joshi S, Guleria RS, Pan J, Bayless KJ, Davis GE, DiPette D, Singh US. 2006. Ethanol impairs Rho GTPase signaling and differentiation of cerebellar granule neurons in a rodent model of fetal alcohol syndrome. *Cell Mol Life Sci* 63:2859-2870.
- Jun SB, Hynd MR, Dowell-Mesfin N, Smith KL, Turner JN, Shain W, Kim, SJ. 2007. Low-density neuronal networks cultured using patterned poly-l-lysine on microelectrode arrays. *J Neurosci Methods* 160(2):317-326.
- Kaech S, Banker G. 2006. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1(5): 2406-2415.
- Kennedy LA, Mukerji S. 1986. Ethanol Neurotoxicity. 1. Direct effects on replicating astrocytes. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology* 8, 11-15.
- Kerr J, Gobé G, Winterford C, Harmon B. 1995. Anatomical methods in cell
- Kerr J, Gobé G, Winterford C, Harmon B. 1995. Anatomical methods in cell death. In *Cell Death*, L.M. Schwartz, and B.A. Osborne, eds. (Academic Press), pp. 1-27.
- Kerr J, Harmon B. 1991. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. In *Apoptosis: the molecular basis of cell death*, L.D. Tomei, and F.O. Cope, eds. (Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 5-29.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-57.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57
- Kim E, Sheng M. 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5, 771–781.
- Kim E, Sheng M. 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5:771–781.
- Kinsella LJ, Riley DE. 1999. Nutritional deficiencies and syndromes associated with alcoholism. In: Goetz CG, Pappert EJ, editors. *Textbook of Clinical Neurology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company 803–806.
- Kreibel RM, Shah AB, McAllister II JP. 1993. The microstructure of cortical neuropil before and after decompression in experimental infantile hydrocephalus. *Ex Neurol* 119:89–98.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16, 3-11
- Köksal M1, Ilgaz C, Erdogan D, Ozogul C, Tong EK, Kalender H. 2005. Ultrastructure of rat pup's Purkinje neurons whose mothers were exposed to ethanol during pregnancy and lactation. *Int J Neurosci*. 115(12):1669-86.

- Laiho KU, Shelburne JD, Trump BF. 1971. Observations on cell volume, ultra-structure, mitochondrial conformation and vital-dye uptake in Ehrlich ascites tumor cells. Effects of inhibiting energy production and function of the plasma membrane. *Am J Pathol* 65, 203-30.
- Lamarche F, Gonthier B, Signorini N, Eysseric H, Barret L. 2003. Acute exposure of cultured neurones to ethanol results in reversible DNA single-strand breaks; whereas chronic exposure causes loss of cell viability. *Alcohol & Alcohol*. 38(6):550-8.
- Leist M, Jäätelä M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-98.
- Levine B, Klionsky DJ. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6, 463-77.
- Lewandowska E1, Stępień T, Wierzbą-Bobrowicz T, Felczak P, Szpak GM, Pasennik E. 2012. Alcohol-induced changes in the developing cerebellum. Ultrastructural and quantitative analysis of neurons in the cerebellar cortex. *Folia Neuropathol* 50(4):397-406.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 14;91(4):479-89.
- Lieber CS. 1997. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clinica Chimica Acta* 257, 59-84.
- Lieber CS. 2000. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *Mount Sinai J Med* 67:84-94.
- Lieber CS. 2001. Alcoholic liver injury: pathogenesis and therapy in 2001. *Pathol Biol* 49:738-52.
- Lindsley TA, Comstock LL, Rising LJ. 2002. Morphologic and neurotoxic effects of ethanol vary with timing of exposure in vitro. *Alcohol* 28(3):197-203.
- Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. 1996. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 25;379(6563):349-53.
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 18;89(2):175-84.
- Lochter A, Taylor J, Braunewell KH, Holm J, Schachner M. 1995. Control of neuronal morphology in vitro: interplay between adhesive substrate forces and molecular instruction. *J Neurosci Res* 42(2):145-158.
- Lokhorst DK, Dnise MJ. 1993a. Effects of ethanol on cultured fetal serotonergic neurons. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 17, 86-93.
- Lokhorst DK, Dnise MJ. 1993b. Effects of ethanol on cultured fetal astroglia. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 17, 810-815.

Longart M, Garcia L, Castillo C, Martinez JC, Medina R, Forsyth P, Malave C. 2009. Sciatic nerve conditioned medium depleted of pro-NGF modulates sodium currents and neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroscience* 159(2):550-558.

Longart M, Liu Y, Karavanova I, Buonanno A. 2004. Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons. *J Comp Neurol* 472(2):156-172.

Lopez Verrilli MA, Pirola CJ, Pascual MM, Dominici FP, Turyn D, Gironacci MM. 2009. Angiotensin-(1-7) through AT2 receptors mediates tyrosine hydroxylase degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *J Neurochem* 109:326-335.

Lossi L, Merighi A. 2003. In vitro cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol* 69, 287-312.

Lovinger DM. 1997. Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356(3):267-82.

Low frequency of the ADH2*2 allele among Atayal natives of Taiwan with alcohol use disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 18(3):640-3.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-75.

Lund JS. 1984. Spiny stellate neurons. En: Peters A., Jones EG. *Cellular components of the cerebral cortex*. New York: Plenum Press. 255-308.

Luo J. 2012. Mechanisms of ethanol-induced death of cerebellar granule cells. *Cerebellum* 11(1):145-54.

Maffi SK, Rathinam ML, Cherian PP, Pate W, Hamby-Mason R, Schenker S, Henderson GI. 2008. Glutathione content as a potential mediator of the vulnerability of cultured fetal cortical neurons to ethanol-induced apoptosis. *J Neurosci Res* 96:1289-1300.

Majno G, Joris I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.

Malunova LB, Samoilov MO. 1984. Early changes in ultrastructure of neurons and neuropil of cat cerebral cortex after anoxia. *Arkh Anat Gistol Embriol* 86:46-49.

Marcussen BL, Goodlett CR, Mahoney JC, West JR. 1994. Developing rat Purkinje cells are more vulnerable to alcohol-induced depletion during differentiation than during neurogenesis. *Alcohol* 1994; 11:147-156.

Mari M, Wu D, Nieto N. 2001. CYP2E1-dependent toxicity and up-regulation of antioxidant genes. *J Biomed Sci* 8:52-8.

Marín MP, Tomás M, Esteban-Pretel G, Megías L, López-Iglesias C, Egea G, Renau-Piqueras J. 2008. Chronic ethanol exposure induces alterations in the nucleocytoplasmic transport in growing astrocytes. *J Neurochem* 106:1914-1928.

Marín MP, Esteban-Pretel G, Ponsoda X, Romero AM, Ballestín R, López C, Megías L, Timoneda J, Molowny A, Canales JJ, Renau-Piqueras J. 2010. Endocytosis in cultured neurons is altered by chronic alcohol exposure. *Toxicol Sci* 115(1):202-13

- Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA, Green DR. 1996. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem* 15; 271(46):28753-6.
- Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C. 1994. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 13(4):1017-30.
- Matsuki T, Matthews RT, Cooper JA, van der Brug MP, Cookson MR, Hardy JA, Olson EC, Howell BW. 2010. Reelin and stk25 have opposing roles in neuronal polarization and dendritic Golgi deployment. *Cell* 143:826–836.
- Mattson S, Riley EP, Gramling L, Delis DC, Jones KL. 1997. Heavy prenatal alcohol exposure with or without physical features of fetal alcohol syndrome leads to IQ deficits. *J. Pediatr.* 131: 718-721.
- McMahon HT, Bolshakov VY, Janz R, Hammer RE, Siegelbaum SA, Südhof TC. 1996. Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* 14;93(10):4760-4.
- Megias L, Guerri C, Fornas E, Azorin I, Bendala E, Sancho-Tello M, Durán JM, Tomás M, Gomez-Lechon MJ, Renau-Piqueras J. 2000. Endocytosis and transcytosis in growing astrocytes in primary culture. Possible implications in neural development. *Int J Dev Biol.* 44(2):209-21.
- Michaud J, Fajardo R, Charron G, Saugageau A, Berrada F, Ramla D, Dilhuydy H, Robitaille Y, Kessous-Elbaz A. 2001. Neuropathology of NFHgp 160 transgenic mice expressing HIV-1 Env protein in neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:574–587.
- Mikami K, Haseba T, Youkichi O. 1997. Ethanol induces transient arrest of cell division (G2 [1] M block) followed by G0/G1 block: dose effects of short- and longer-term ethanol exposure on cell cycle and cell functions. *Alcohol and Alcoholism* 32, 145–152.
- Miller MW. 1996. Limited ethanol exposure selectively alters the proliferation of precursor cells in the cerebral cortex. *Alcohol Clin Exp Res* 20(1):139-43.
- Miller TM, Moulder KL, Knudson CM, Creedon DJ, Deshmukh M, Korsmeyer SJ, Johnson EM Jr. 1997. Bax deletion further orders the cell death pathway in cerebellar granule cells and suggests a caspase-independent pathway to cell death. *J Cell Biol* 6;139(1):205-17.
- Misonou H, Trimmer JS. 2005. A primary culture system for biochemical analyses of neuronal proteins. *J Neurosci Methods* 144(2):165-173.
- Mitchell J, Paiva M, Heaton MB. 1999. The antioxidants vitamin E and carotene protect against ethanol-induced neurotoxicity in embryonic rat hippocampal cultures. *Alcohol* 17, 163–168.
- Molina-Holgado F, Gaeta A, Francis PT, Williams RJ, Hider RC. 2008. Neuroprotective actions of deferiprone in cultured cortical neurones and SHSY-5Y cells. *J Neurochem* 105:2466-2476.

- Moulder KL, Fu T, Melbostad H, Cormier RJ, Isenberg KE, Zorumski CF, Mennerick S. 2002 Ethanol-induced death of postnatal hippocampal neurons. *Neurobiol Dis* 10(3):396-409.
- Mulholland PJ, Chandler LJ. 2007. The thorny side of addiction: adaptive plasticity and dendritic spines. *Scientific WorldJournal* 7, 9–21.
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273(5):2926-30.
- Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 7;88(3):355-65.
- Nagy LE. 2004. Molecular aspects of alcohol metabolism: transcription factors involved in early ethanol-induced liver injury. *Annu Rev Nutr* 24:55-78.
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403(6765):98-103.
- Narayan PJ, Gibbons HM, Mee EW, Faull RL, Dragunow M. 2007. High throughput quantification of cells with complex morphology in mixed cultures. *J Neurosci Methods* 164(2):339-349.
- Navasumrit P, Ward TH, O'Connor P J, Nair J, Frank N, Bartsch H. (2001) Ethanol enhances the formation of endogenously and exogenously derived adducts in rat hepatic DNA. *Mutation Research* 479, 81–94.
- Neurosci Res* 35(5):567-576.
- Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC. 1994. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 79, 353-64.
- Nichols AJ, Olson EC. 2010. Reelin promotes neuronal orientation and dendritogenesis during preplate splitting. *Cereb Cortex* 20:2213–2223.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376(6535):37-43.
- Nimchinsky EA, Yasuda R, Oertner TG, Svoboda K. 2004. The number of glutamate receptors opened by synaptic stimulation in single hippocampal spines. *J Neurosci* 24:2054–2064.
- Nordmann R, Ribière C, Rouach H. 1992. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Radic Biol Med* 12(3):219-40.
- Nowoslawski L, Klocke BJ, Roth KA. 2005. Molecular regulation of acute ethanol-induced neuron apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 164(6):490-7.
- Oberdoerster J, Rabin RA. 1999. Enhanced caspase activity during ethanol-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *Eur J Pharmacol* 385:273–82.

Olney JW, Tenkova T, Dikranian K, Muglia LJ, Jermakowicz WJ. 2002. Ethanol induced caspase-3 activation in the in vivo developing mouse brain. *Neurobiol Dis* 9:205-219.

Olney JW. 2004. Fetal alcohol syndrome at the cellular level. *Addict Biol* 9:137–49.

Palay SL, Chan-Palay V. 1974. Cerebellar cortex: cytology and organization. New York: Springer.

Pantazis NJ, Dohrman DP, Goodlett CR, Cook RT, West JR. 1993. Vulnerability of cerebellar granule cells to alcohol-induced cell death diminishes with time in culture. *Alcohol Clin Exp Res* 17:1014–1021.

Parnell SE, O'Leary-Moore SK, Godin EA, Dehart DB, Johnson BW, Allan Johnson G, Styner MA, Sulik KK. 2009. Magnetic resonance microscopy defines ethanol-induced brain abnormalities in prenatal mice: effects of acute insult on gestational day 8. *Alcohol Clin Exp Res* 33, 1001–1011.

Pascual M, Guerri C. 2007. The peptide NAP promotes neuronal growth and differentiation through extracellular signal-regulated protein kinase and Akt pathways, and protects neurons co-cultured with astrocytes damaged by ethanol. *J of Neurochemistry* 103,557-568.

Pavelka M, Roth J. 2005. Functional Ultrastructure An Atlas of Tissue Biology and Pathology. New York: Springer Wien 295.

Pentney RJ, Miller MW. 1992. Effects of ethanol on neuronal morphogenesis. In: Miller MW editors. *Development of the Central Nervous System (Effects of Alcohol and Opiates)*. New York: Wiley-Liss; p. 71–107

Peters A, Leahu D, Moss MG, McNally KJ. 1994. The effects of aging on area 46 of the frontal cortex of the rhesus monkey. *Cereb Cortex* 6:621–635.

Pierce DR, Goodlett CR, West JR. 1989. Differential neuronal loss following early postnatal alcohol exposure. *Teratology* 40:113–126.

Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. 1997. Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J Comp Neurol* 378, 88-104.

Powrozek TA, Olson EC. 2012. Ethanol-induced disruption of Golgi apparatus morphology, primary neurite number and cellular orientation in developing cortical neurons. *Alcohol*. 46(7):619-27.

Raoul C, Pettmann B, Henderson CE. 2000. Active killing of neurons during development and following stress: a role for p75(NTR) and Fas? *Curr Opin Neurobiol* 10(1):111-7.

Renvoize C, Biola A, Pallardy M, Breard J. 1998. Apoptosis: identification of dying cells. *Cell Biol Toxicol* 14(2):111-120.

Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG. 2005. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol*. 10;5:12.

Rice JP, Suggs LE, Lusk AV, Parker MO, Candelaria-Cook FT, Akers KG, Savage DD, Hamilton DA. 2012. Effects of exposure to moderate levels of ethanol during prenatal

brain development on dendritic length, branching, and spine density in the nucleus accumbens and dorsal striatum of adult rats. *Alcohol*. 46(6):577-84.

Riley EP, Mc Gee CL. 2005. Fetal alcohol spectrum disorder: an overview with emphasis of changes in brain and behavior. *Exp Biol Med* 230, 357-365.

Riveros-Rosas H, Julian-Sanchez A, Pinã E. 1997. Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Arch Med Res Winter* 28(4):453-71.

Robert F, Cloix JF, Hevor T. 2012. Ultrastructural characterization of rat neurons in primary culture. *Neurosci* 3;200:248-60.

Romero AM, Esteban-Pretel G, Marín MP, Ponsoda X, Ballestín R, Canales JJ, Renau-Piqueras J. 2010. Chronic ethanol exposure alters the levels, assembly, and cellular organization of the actin cytoskeleton and microtubules in hippocampal neurons in primary culture. *Toxicol Sci* 118(2):602-12.

Romero AM, Renau-Piqueras J, Marin MP, Timoneda J, Berciano MT, Lafarga M, Esteban-Pretel G. 2013. Chronic Alcohol Alters Dendritic Spine Development in Neurons in Primary Culture. *Neurotox Res* 24:532–548.

Ron D. 2004. Signaling cascades regulating NMDA receptor sensitivity to ethanol. *Neuroscientist* 10(4):325-36.

Rouquette J. 1957. Influence des l'intoxication alcoolique parentele sur le developement physique des jeunes infants. These Université de Paris.

Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1;16(23):6914-25.

Saito M, Saito M, Berg MJ, Guidotti A, Marks N. 1999. Gangliosides attenuate ethanol-induced apoptosis in rat cerebellar granule neurons. *Neurochem Res* 24:1107–15.

Samudio-Ruiz, SL, Allan AM, Sheema S, Caldwell KK. 2010. Hippocampal N-methyl-d-aspartate receptor subunit expression profiles in a mouse model of prenatal alcohol exposure. *Alcohol. Clin. Exp Res* 34, 342–353.

Sánchez C, Díaz-Nido J, Avila J. 2000. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 61(2):133-68.

Sastry PS, Rao KS. 2000. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 74(1):1-20.

Sastry PS, Rao KS. 2000. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 74:1-20.

Sepulveda B, Carcea I, Zhao B, Salton SR, Benson DL. 2011. L1 cell adhesion molecule promotes resistance to alcohol-induced silencing of growth cone responses to guidance cues. *Neuroscience* 180:30–40.

Schluter OM, Xu W, Malenka RC. 2006. Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function. *Neuron* 51:99–111.

- Schmitt U, Tanimoto N, Seeliger M, Schaeffel F, Leube RE. 2009. Detection of behavioral alterations and learning deficits in mice lacking synaptophysin. *Neuroscience* 162:234–243.
- Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Brecht DS, Nicoll RA. 2002. Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13902–13907.
- Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, Osborne BA. 1993. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 980–4.
- Serbus DC, Young MW, Light KE. 1986. Blood ethanol concentrations following intragastric intubation of neonatal rat pups. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8, 403–406.
- Shaikh S, Nicholson LF. 2008. Advanced glycation end products induce in vitro cross-linking of alpha-synuclein and accelerate the process of intracellular inclusion body formation. *J Neurosci Res* 86(9):2071–2082.
- Sheng M, Sala C. 2001. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes.
- Siler-Marsiglio KI, Shaw G, Heaton MB. 2004. Pycnogenol and vitamin E inhibit ethanol-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J Neurobiol* 59:261–71.
- Singh NP, Lai H, Khan A. 1995. Ethanol-induced singlestrand DNA breaks in the rat brain cells. *Mutation Research* 345, 191–196.
- Smith DE, Davies DL. 1990. Effect of perinatal administration of ethanol on the CA1 pyramidal cell of the hippocampus and Purkinje cell of the cerebellum: an ultrastructural survey. *J Neurocytol* 19(5):708–17.
- Smith DE, Davies DL. 1990. Effect of perinatal administration of ethanol on the CA1 pyramidal cell of the hippocampus and the Purkinje cell of the cerebellum: an ultrastructural survey. *J Neurocytol* 19:708–717.
- Smith DE, Foundas A, Canale J. 1986. Effect of perinatally administered ethanol on the development of the cerebellar granule cell. *Exp Neurol* 92(3):491–501.
- Snyder AK, Singh SP, Ehmann S. 1992. Effects of ethanol on DNA, RNA, and protein synthesis in rat astrocyte cultures. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 16, 295–300.
- Sordella R, Van Aelst L. 2006. Driving actin dynamics under the influence of alcohol. *Cell* 127:37–39.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. 1996. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 10;93(25):14486–91.
- Stein V, House DR, Brecht DS, Nicoll RA. 2003. Postsynaptic density-95 mimics and occludes hippocampal long-term potentiation and enhances long-term depression. *J Neurosci* 23:5503–5506.

- Stennicke HR, Salvesen GS. 1998. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 8; 1387(1-2):17-31.
- Stoltenburg-Didinger G, Spohr HL. 1983. Fetal alcohol syndrome and mental retardation: spine distribution of pyramidal cells in prenatal alcohol-exposed rat cerebral cortex, a Golgi study. *Brain Res* 313:119-123.
- Stratton K, Howe C, Battaglia F. 1996. *Fetal Alcohol Syndrome (Diagnosis, Epidemiology, Prevention, and Treatment)*. Washington, DC: National Academy Press.
- Streissguth AP, O'Malley K. 2000. Neuropsychiatric implications and long-term consequences of fetal alcohol spectrum disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry* 5(3):177-90.
- Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM. 1999. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J Biol Chem* 19;274(8):5053-60.
- Tabakoff B, Ellevuo K, Hoffman PL. 1996. Alcohol. In: *Pharmacological Aspect of Drug Dependence. Handbook of Experimental Pharmacology*, pp. 374–460. Eds. C. R. Schuster and M. J. Kuhar. Springer, Berlin.
- Tanaka F, Shiratori Y, Yokosuka O, Imazeki F, Tsukada Y, Omata M. 1996. High incidence of ADH2*1/ALDH2*1 genes among Japanese alcohol dependents and patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 23:234–239.
- Tarsa L, Goda Y. 2002. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 22;99(2):1012-1016.
- Tavares MA, Paula-Barbosa MM. 1983. Mitochondrial changes in rat Purkinje cells after prolonged alcohol consumption a morphologic assessment. *J Submicorsc Cytol* 15:713–720.
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. 1995. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 2;81(5):801-9.
- Theil EC. 1993. The IRE (iron regulatory element) family: structures which regulate mRNA translation or stability. *Biofactors* 4(2):87–93.
- Thomasson HR, Crabb DW, Edenberg HJ, Li TK, Hwu HG, Chen CC, Yeh EK, Yin SJ. 1994.
- Thurman RG, Bradford BU, Iimuro Y, et al. 1999. Mechanisms of alcohol-induced hepatotoxicity: studies in rats. *Frontiers Biosci* 4:e42-46.
- Tizabi Y, Manaye KF, Taylor RE. 2005. Nicotine blocks ethanol-induced apoptosis in primary cultures of rat cerebral cortical and cerebellar granule cells. *Neurotox Res* 7:319–22.
- Tomás M, Marín MP, Megías L. 2005. Ethanol perturbs the secretory pathway in astrocytes. *Neurobiol Dis* 20:773–84.

- Trump BF, Goldblatt PJ, Stowell RE. 1965. Studies on necrosis of mouse liver in vitro. Ultrastructural alterations in the mitochondria of hepatic parenchymal cells. *Lab Invest* 14, 343-71.
- Tsai G, Gastfriend DR, Coyle JT. 1995. The glutamatergic basis of human alcoholism. *Am J Psychiatry* 152(3):332-40.
- Tucker RP, Binder LI, Viereck C, Hemmings BA, Matus AI. 1988. The sequential appearance of low- and high-molecular-weight forms of MAP2 in the developing cerebellum. *J Neurosci* 8(12):4503-12.
- Ullah I, Ullah N, Naseer M I, Lee HY , Kim M. 2012. Neuroprotection with metformin and thymoquinone against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in prenatal rat cortical neurons. *BMC Neuroscience* 13:11.
- Uludag H, Sefton MV. 1990. Colorimetric assay for cellular activity in microcapsules. *Biomaterials* 11(9):708-12.
- Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL. 1996. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10):4974-8.
- Valverde F. 2002. Structure of the cerebral cortex. Intrinsic organization and comparative analysis of the neocortex. *Rev Neurol* 34:758-780.
- Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11,700-14.
- Vangipuram SD, Grever WE, Parker GC, Lyman WD. 2008. Ethanol increases fetal human neurosphere size and alters adhesion molecule gene expression. *Alcohol Clin Exp Res* 32:339–347.
- Vaudry D, Rousselle C, Basille M, Falluel-Morel A, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez B. 2002. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 6398–6403.
- Vawter MP, Howard AL, Hyde TM, Kleinman JE, Freed WJ. 1999. Alterations of hippocampal secreted N-CAM in bipolar disorder and synaptophysin in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 4(5):467-75.
- Vogt C, Vogt O. 1919. Allgemeinere Ergebnisse unserer Hirnforschung. *J. Psychol. Neurol.* 25: 279-462.
- Wakayama I, Nerukar VR, Garruto RM. 1993. Immunocytochemical and ultrastructural evidence of dendritic degeneration in motor neurons of aluminumintoxicated rabbit. *Acta Neuropathol* 85:122–128.
- Wenisch S, Hild A, Bitsch I, Leiser R, Hummel G. 1997. Ultrastructure of rat Purkinje neurons after chronic ethanol consumption and prolonged abstinence. *Anat Histol Embryol* 26(2):93-8.

- Wimalasena J. 1994. Ethanol has direct effects on human choriocarcinoma cell steroid hormone secretion. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 18, 369-374.
- Wozniak DF, Hartman RE, Boyle MP, Vogt SK, Brooks AR, Tenkova T, et al. 2004. Apoptotic neurodegeneration induced by ethanol in neonatal mice is associated with profound learning/memory deficits in juveniles followed by progressive functional recovery in adults. *Neurobiol Dis* 17:403-14.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Xu W, Schluter OM, Steiner P, Czervionke BL, Sabatini B, Malenka RC. 2008. Molecular dissociation of the role of PSD-95 in regulating synaptic strength and LTD. *Neuron* 57:248–262.
- Yang X, Chang HY, Baltimore D. 1998. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 28;281(5381):1355-7.
- Yanni PA, Lindsley TA. 2000. Ethanol inhibits development of dendrites and synapses in rat hippocampal pyramidal neuron cultures. *Dev Brain Res* 120:233-243.
- Zhang FX, Rubin R, Rooney TA. 1998a. N-Methyl-D-aspartate inhibits apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cerebellar granule neurons. A role for insulin receptor substrate-1 in the neurotrophic action of n-methyl-D-aspartate and its inhibition by ethanol. *J Biol Chem* 273:26596–602.
- Zhang FX, Rubin R, Rooney TA. 1998b. Ethanol induces apoptosis in cerebellar granule neurons by inhibiting insulin-like growth factor 1 signaling. *J Neurochem* 71:196–204.
- Zhang QL, Boscolo P, Niu PY, Wang F, Shi YT, Zhang L, Wang LP, Wang J, Di Gioacchino M, Conti P, Li QY, Niu Q. 2008. How do rat cortical cells cultured with aluminum die: necrosis or apoptosis?. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 21(1):107-15.
- Zima T, Kalousova M. 2005. Oxidative stress and signal transduction pathways in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 29:110S-15S.
- Zong WX, Thompson CB. 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* 20, 1-15.